Aus dem Pathologischen Institut der Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. R. Roessle)

Über das Verhalten von Knochenmark in der Gewebskultur

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

an der Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Berlin

vorgelegt von

Herbert Rasmussen
aus Altona

Jena
Gustav Fischer
1933

564

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. R. Roessle)

Über das Verhalten von Knochenmark in der Gewebskultur

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

an der Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Berlin

vorgelegt von

Herbert Rasmussen
aus Altona

Tag der Promotion: 12. Sep. 1933

Jena
Gustav Fischer
1933

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Berlin.

Dekan: Prof. Dr. H. Gocht

Referent: Prof. Dr. R. Roessle

Abdruck aus

Archiv für experimentelle Zellforschung, besonders Gewebezüchtung (Explantation)

1933, Band XIV, Heft 2

Verlag von Gustav Fischer in Jena

Einleitung.

Die Fragen nach der Abstammung, der Entwicklung und den gegenseitigen Beziehungen zwischen einzelnen Zellformen des Blutes sind eins der umstrittensten Kapitel der medizinischen Biologie. Jede nur mögliche Vorstellung über die Entwicklungsrichtungen der einzelnen Blutzellreihen und jede nur denkbare Deutung von ihren Beziehungen zueinander hat ihre Vertreter gefunden. Die Auseinandersetzung zwischen den Anhängern der verschiedenen Ansichten, die schon Jahrzehnte andauert, scheint sich mit der Zeit mehr zuzuspitzen, als zu gemeinsamen Vorstellungen zu führen.

Die einander bekämpfenden Anschauungen von der Genese der Blutzellen schöpfen ihre Unterlagen und Beweise aus der gleichen Quelle. Die Basis für alle Untersuchungen stellen histologische Zellbilder dar, welche entweder als Ausstriche aus dem Blut oder als Schnitte aus gesunden und erkrankten blutbildenden Organen gewonnen werden.

Es läßt sich nicht bestreiten, daß die methodologischen Schwierigkeiten, Unzulänglichkeit der Untersuchungstechnik, das Nichtübereinstimmen zwischen den zu lösenden Aufgaben und den zur Verfügung stehenden Mitteln die Erforschung der blutbildenden Vorgänge erheblich erschwert haben. Versuche, die Möglichkeiten der histologischen Technik durch neuzeitliche histochemische und vitalfärberische Unter-

suchungsmethoden zu erweitern, haben nichts Entscheidendes zur Klärung dieser Fragen beitragen können. Die Ursache für das Versagen der zur Verfügung stehenden Arbeitsmethoden liegt tiefer.

Die klassische Histologie erweist sich für die Erforschung von histogenetischen Prozessen, die sich in der Zeit abspielen, als unzulänglich. Vielen von den auf dem Gebiete der Histogenese arbeitenden Forschern ist es allmählich klar geworden, daß zur Erlangung eines Verständnisses der histogenetischen Vorgänge die methodologische Grundlage ihrer Wissenschaft ergänzungsbedürftig ist.

Die Methode der Gewebezüchtung tritt dabei entscheidend in den Vordergrund, denn sie allein scheint den vorliegenden Forderungen wenigstens zum Teil gerecht werden zu können.

Seit es A. Maximow als erster unternommen hat, seine Anschauung über die Genese von Blut- und Bindegewebszellen durch gewebszüchterische Untersuchungen zu stützen und auf diese aufzubauen, ist dieser Weg von vielen namhaften Histologen, Hämatologen und Pathologen beschritten worden (W. v. Möllendorff, G. Herzog, Aschoffsche Schule, H. Hirschfeld u. a.).

Trotzdem sich die Zahl der hämatologischen Untersuchungen, die an Gewebskulturen angestellt werden, von Tag zu Tag mehrt, sind die Erkenntnisse, die mit der neuen Methode bisher gewonnen wurden, noch unbefriedigend. Die Zahl der Untersuchungen über das grundsätzliche Verhalten der Blut- und Lymphzellen bildenden Organe in vitro selbst ist noch sehr gering. Besonders wenig Aufmerksamkeit wurde bisher dem Hauptorgan der Hämatopoese, dem Knochenmark, geschenkt. Die Hauptarbeiten über Knochenmarkskulturen fallen in die Zeit der Anfänge der Gewebezüchtung und besitzen heute mehr eine historische als sachliche Bedeutung. Neuere Arbeiten sind nur der Untersuchung von Teilproblemen gewidmet.

Auf Anregung und unter Anleitung von Dr. L. Doljanski haben wir unternommen, die Frage nach dem Verhalten von Knochenmark in vitro neu aufzugreifen. Wir hatten es uns zur Aufgabe gemacht, die Entwicklungsformen der verschiedenen Zellelemente des Knochenmarks möglichst allseitig und vollständig zu verfolgen, um auf diese Weise zur Kenntnis des allgemeinen Verhaltens des Knochenmarks in vitro zu gelangen. Diese Kenntnis schien uns als Grundlage für jede weitergehende spezielle Fragestellung im Gebiete der Histogenese der Blutelemente erforderlich zu sein. Mit diesem Gegenstand, und mit ihm allein, war unser Aufgabenkreis fest umrissen.

Schrifttum.

Der erste Bericht über das Verhalten von Knochenmarkkulturen in vitro stammt von N. C. Foot (1911). Seine Pionierarbeit auf dem Gebiete der Gewebezüchtung verdient auch jetzt noch besondere Beachtung. Die Untersuchung wurde unternommen, um zur Klärung der Entwicklung des Fettgewebes beizutragen. Den Vorgängen an dem Knochenmarkparenchym selbst schenkte der Verfasser in dieser ersten Arbeit nur geringes Interesse. Als Material wurde Femurknochenmark vom Huhn benutzt. Die Kulturen wurden als Deckglaskulturen nach der Methode von A. Carrel und M. Burrows angelegt und in regelmäßigen Zeitabständen umgesetzt. Embryonalextrakt fand keine Verwendung, da man dessen Anwendungsmöglichkeit für die Gewebezüchtung damals noch nicht kannte. Die Kulturen wurden in gefärbtem und ungefärbtem Zustand untersucht. Ihre Lebensdauer betrug durchschnittlich eine Woche.

Sechs Stunden nach dem Ansetzen der Kultur beginnt eine lebhafte Auswanderung von Zellen aus dem Mutterstück. Der Wachstumshof besteht aus wenigen gesunden Erythrozyten, mehr polymorphkernigen Leukozyten und besonders aus großen, mononukleären, basophilen, amöboiden, lebhaft phagozytierenden Zellen, die die Hauptmasse der auswandernden Zellformen ausmachen. Die letzten beschreibt der Verfasser unter dem Namen „X-Zellen" und glaubt in ihnen aus dem Knochenmarkretikulum stammende, „indifferent gewordene Mesenchymzellen" sehen zu können. Der Kern der X-Zelle blaßt in der Kultur allmählich ab und wird auf diese Weise dem eines Histiozyten sehr ähnlich. Diese Zellen fließen oft ineinander über und bilden auf diese Weise mehrkernige Riesenformen, die der Verfasser als „Kulturriesenzellen" bezeichnet. Ähnliche Riesenzellen können auch durch mehrfache Zersprengung des Kerns (Amitose) ohne nachfolgende Zellteilung entstehen. Die Riesenzellen splittern sich später wieder in einkernige Rundzellen auf. Über das Schicksal der Zellen des hämatopoetischen Systems im Knochenmark äußert sich der Autor kaum. Sie fallen anscheinend sehr schnell dem Zerfall anheim.

In seiner zweiten Arbeit setzt N. C. Foot (1913) seine Knochenmarkuntersuchungen am gleichen Material fort. Diesmal richtet der Verfasser seine Aufmerksamkeit mehr auf das Verhalten des Knochenmarkparenchyms selbst.

Auch diesmal berichtet der Verfasser über eine sofort nach dem Ansetzen der Kultur beginnende Zellauswanderung, die sich hauptsächlich aus polymorphkernigen Leukozyten zusammensetzt. Die Leukozyten der Kultur unterscheiden sich von denen im Blute durch ihre bedeutende Größe. Neben ihnen finden sich Zellen mit Nieren- oder Hufeisenkernen und andere, welche die Eigenschaften eines Myelozyten besitzen. Bald nach den Zellen der myeloischen Reihe treten in der Wachstumszone reife, gesunde Erythrozyten auf. Diesmal erwähnt der Verfasser noch einen weiteren Zelltyp, der drei Stunden nach dem Ansetzen der Kultur in beträchtlicher Zahl in den Kulturen erscheint. Es handelt sich um

ganz kleine, amöboide, sehr bewegliche, rundkernige Zellen, die der Verfasser als „Mikrolymphozyten" anspricht. Diese Zellen besitzen in vitro ein ausgesprochenes Vermögen zu einer Weiterentwicklung und Differenzierung. Die nur in geringer Zahl ausgeschwemmten Erythrozyten gehen bald unter Erscheinungen von Pyknose des Kerns oder Karyolyse zugrunde.

Das größte Umwandlungsvermögen kommt in der Kultur den „lymphozytären Zellen" zu. Bei Vergrößerung ihres Zelleibes ohne entsprechende Vergrößerung ihres Kernes entstehen aus ihnen Formen, die den „großen mononukleären Lymphozyten" entsprechen. Bei alleiniger Vergrößerung des Kerns ohne entsprechendes Wachstum des Zytoplasmas entstehen Zellen vom „makrolymphatischen Typ". Da bei diesen die Vergrößerung des Zytoplasmas nachfolgen kann, bilden sich auf diese Weise auch aus den Makrolymphozyten wiederum „große mononukleäre Lymphozyten". Die Makrolymphozyten werden also als Übergangsformen zwischen Mikrolymphozyten und großen mononukleären Lymphozyten angesehen. Der große mononukleäre Lymphozyt behält seine typische Form nur kurze Zeit. Entweder geht seine Umwandlung über Myelozyten zu polymorphkernigen Leukozyten vor sich, oder der große mononukleäre Typ wandelt sich unter fortschreitender Verfettung zu Fettzellen um oder gibt den Ursprung zu typischen, histiozytären Klasmatozyten.

Die Arbeit von Rhoda Erdmann (1917), die ebenfalls an Hühnerknochenmark ausgeführt wurde, ist hauptsächlich der Auseinandersetzung mit den beiden eben erwähnten Arbeiten von Foot gewidmet.

Die Verfasserin hält die Behauptung N. C. Foots, daß sich in seinen Kulturen aus Mikrolymphozyten sowohl Makrolymphozyten, große mononukleäre Lymphozyten wie myeloische Zellen entwickelt hätten, für nicht genügend begründet. Ebenso scheint es ihr einer Nachprüfung zu bedürfen, daß sich aus all diesen Zelltypen histozytäre Elemente bilden sollen.

Rhoda Erdmann beschreibt die Auswanderung der Zellen aus dem Keimstück auf folgende Weise: Als erste Zellen erscheinen polymorphkernige, amöboide Leukozyten und kleine Myelozyten, danach gut erhaltene Erythrozyten und Normoblasten. Ihnen folgen größere mononukleäre, nicht granulierte lierte Zellen, welche die Verfasserin den „X-Zellen" Foots gleichsetzt. Schon am ersten Tag finden sich in der Kultur Mikrolymphozyten mit einem chromatinreichen, dichten Kern. Den Ursprung der in den Kulturen schon früh auftretenden spindeligen Bindegewebszellen verlegt die Verfasserin in das Knochenmarknetzwerk und die Gefäßendothelien.

Die mononukleären (Myelozyten) und polymorphkernigen Leukozyten verändern sich in der Kultur nur regressiv, und zwar auf eine zweifache Art: entweder teilen sie sich schon in den ersten Stunden nach der Explantation und lassen auf diese Weise kleine Zellen mit nur wenigen Körnchen und deutlich basophilem Protoplasma entstehen. Im anderen Fall verfallen sie sofort einer rasch einsetzenden Degeneration unter Erscheinungen von Kernzerfall und Ausscheidung ihrer Körnchen. Dem gleichen Schicksal erliegen die Zellen der erythropoetischen Reihe. Ihr Zerfall geht um so schneller vor sich, je weiter ihre Differenzierung fortgeschritten war. Die auswandernden Mikrolymphozyten, die im Hühnerknochenmark sehr reichlich vertreten sind, zeigen bis zum letzten Züchtungstag keine progressive Entwicklung.

Aus den auswandernden mononukleären, basophilen Zellen mit großem, sich hell färbenden Kern und zwei Nukleolen („X-Zellen Foot's) entwickeln sich weiterhin zwei Zelltypen. Einmal eine Zelle mit einem kleinen, dichten, chromatinreichen Kern, die einer Fettzelle sehr ähnlich sieht; zum andern ein Zelltyp, der durch seinen großen, länglichen, chromatinarmen Kern das Aussehen einer wahren Bindegewebszelle besitzt. Beide Varianten sind phagozytierende Wanderzellen, die verfetten und sich schließlich auf die bekannte Weise über Riesenzellen zum „Zellkulturtyp" umwandeln. Rh. Erdmann bestätigt also hinsichtlich der Riesenzellfrage die Möglichkeit der Bildung aus „X-Zellen", wie sie Foot in seiner ersten Arbeit annimmt. Sie fügt diesen die Fettzelle als Stammzelle zu, lehnt aber ihre Entstehung aus myeloischen oder lymphozytären Elementen ab.

Die bisher erwähnten Arbeiten beschäftigen sich ausschließlich und in ausführlicher Weise mit Hühnerknochenmark als Ausgangsmaterial. Knochenmark der Säugetiere fand bisher mit einer Ausnahme keine entsprechende Bearbeitung.

Die einzige[1]) zusammenfassende Arbeit über das Schicksal von Säugetierknochenmark in vitro stammt von W. Grossmann (1923) aus dem Institut von Rh. Erdmann. Als Objekt diente Knochenmark junger Meerschweinchen.

Nach 4—6 Stunden findet sich in der Kultur eine starke Ausschwemmung polymorphkerniger Leukozyten. Ihnen folgen nach 24 Stunden Myelozyten. Zwischen den weißen Blutzellen liegen zahlreiche ausgeschwemmte Normoblasten und Erythrozyten. Erst am zweiten und dritten Tag beginnt das Auswandern von retikulo-endothelialen, histiozytären Elementen. In derselben Zeit erscheinen außerordentlich lebhaft bewegliche Lymphozyten. Über das Schicksal der einzelnen Zellen äußert sich der Verfasser folgendermaßen: Am widerstandsfähigsten von allen Rundzellen sind die kleinen Lymphozyten. W. Großmann hat, wie Rh. Erdmann, niemals eine Umwandlung von Lymphozyten in andere Zellformen beobachten können. Die Normoblasten stoßen nach 24—48 Stunden ihren Kern aus, der bald danach rasch zerfällt. Die polymorphkernigen Leukozyten sind sehr empfindlich und gehen bereits 2 Tage nach dem Ansetzen der Kultur zugrunde. Sehr labil sind in der Kultur die Myeloblasten, die bald nicht mehr mit

1) Die von A. Maximow im Jahre 1916 mitgeteilten Befunde an Kaninchen-Knochenmarkskulturen waren uns im Original nicht zugänglich. In seinem eben erschienenen Handbuchartikel: „Ergebnisse der Züchtungsversuche von Blut und blutbildenden Organen" (Handbuch der allgemeinen Hämatologie, herausgegeben von H. Hirschfeld und A. Hittmair) berichtet W. Bloom über diese Arbeit folgendes: „Im Laufe des ersten Tages sondern sich granulierte und nicht granulierte wandernde Elemente von dem Explantat ab. Myelozyten können bis zu 5 Tagen lebendig bleiben und sich teilen; die meisten aber degenerieren. In Markkulturen neugeborener Kaninchen, in denen sich eine große Anzahl nichtgranulierter, amöboider Elemente befand, finden sich alle Übergänge von kleinen Lymphozyten bis zu großen Polyblasten und sich mitotisch teilenden Fibroblasten. Nach 2 Tagen kam es zur Umwandlung der Fibroblasten in Fettzellen."

Sicherheit zu erkennen sind. Myelozyten sind viel widerstandsfähiger, Mitosen wurden bei beiden Zellformen nicht beobachtet, dagegen sehr oft amitotische Kernteilungen. Die auswandernden histiozytären Zellen teilt der Verf. in drei Gruppen ein: „endotheliale Zellen, Reticulum-Zellen und typische histiozytäre Wanderzellen". Sie bilden teils synzytiale Netze, teils in reger Mitose kleine runde, basophile Zellen mit bläschenförmigem, relativ großen Kern, die keine Neigung zur Umwandlung in Lymphozyten oder Granulozyten zeigen.

Eine weitere Mitteilung über Knochenmarkskulturen in vitro verdanken wir M. van Herwerden (1923). Ihre Fragestellung galt hauptsächlich dem Schicksal des Normoblastenkerns. Als Objekt benutzte die Verfasserin Tibiaknochenmark von Meerschweinchen, Hund, Katze und Ratten, als Medium mit Ringer verdünntes Plasma, anscheinend ohne Embryonalextrakt. Es wurden hauptsächlich lebende Kulturen untersucht. Die Verf. beschreibt ausführlich den Vorgang der Entkernung der Normoblasten. Diese geschieht ausschließlich durch Ausstoßung des Kerns. Der ausgestoßene Kern kontrahiert sich und wandelt sich in ein Gebilde um, das einem Thrombozyten fast vollkommen entspricht. Die Erythrozyten bleiben nach der Kernausstoßung als „Schale" zurück. Die Megakaryozyten gehen in den Kulturen sehr schnell zugrunde und weisen nie Veränderungen auf, die für eine Blutplättchenbildung sprechen könnten.

Eine im Institut von Rh. Erdmann ausgeführte Arbeit von G. Bermann (1925) über Infektion von Knochenmarkskulturen des Meerschweinchens bringt hinsichtlich der Wachstums- und Differenzierungsvorgänge von Blutzellen und bindegewebigen Zellen nichts, was über die obigen Arbeiten hinausgeht.

Ebenso finden wir hinsichtlich der Umwandlungen von Zellen des Knochenmarks in vitro in den Arbeiten von R. W. Tower und C. F. Herm (1917), N. Michels (1923), F. Mas y Magro (1932) und A. v. Geney (1932) nichts Wesentliches.

Technik.

Als Ausgangsmaterial für unsere Versuche kam Knochenmark 12—14 Tage alter Kaninchen zur Anwendung. Wir entnahmen es der Tibia, die durch ihre gut ausgebildete Knochenhöhle für die Gewinnung kompakter Knochenmarkpartikel ohne Beimengung von Spongiosabälkchen besonders gut geeignet ist. Zur Gewinnung des Knochenmarks wurden die Tiere durch Genickschlag getötet und das Mark gleich darauf steril entnommen. Einen Teil des Materials haben wir sofort nach der Entnahme fixiert und histologisch untersucht. Die mikroskopische Betrachtung ergab, daß die zur An-

wendung kommenden Knochenmarkstückchen stets eine weitgehend gleiche quantitative und qualitative Zusammensetzung des Zellbestandes besaßen.

Das Knochenmark haben wir nach der Deckglasmethode sowie in Flaschen gezüchtet. Als Medium wurde homologes Plasma neben einem Zusatz von Hühnerembryonalextrakt verwandt. Wir gewannen das Plasma aus der Karotis. Um eine zu schnelle Gerinnung des Plasmas zu verhindern, wurde dem Plasma Heparin bis zu der Verdünnung 1:10000 zugesetzt.

Da die Knochenmarkkulturen in späteren Passagen sehr zu einer Verflüssigung des Plasmakoagulums neigen, waren wir gezwungen, statt homologen Plasmas oft eine Mischung desselben mit Hühnerplasma zu benutzen. Dieser Zusatz verleiht dem Plasmagerinnsel eine größere Festigkeit, ohne dabei das Zellwachstum ungünstig zu beeinflussen.

Die Neigung der Kulturen, das Plasma zu verflüssigen, ist sehr verschieden stark ausgeprägt. Oft wird das koagulierte Plasma schon bald nach dem Ansetzen angedaut, manchmal fehlt diese Verflüssigung aber auch bei weiterer Züchtung vollständig. Diesem Umstand ist es zu verdanken, daß es uns auch bei Verwendung reinen homologen Plasmas gelungen ist, eine große Zahl von Kulturen lange Zeit hindurch ohne Verflüssigung zu erhalten. Der Zusatz heterologen Plasmas soll auf jeden Fall 25 Proz. nicht überschreiten.

Embryonalextrakt haben wir nach den allgemeinen Vorschriften (A. Fischer) gewonnen und in verschiedenen Konzentrationen angewandt. Die Konzentration des Embryonalextraktes ist für die Entwicklungsrichtung, welche die Kulturen einschlagen, von entscheidender Bedeutung. Eine relativ hohe Konzentration begünstigt das Wachstum der seßhaften, spindeligen Zellen, während hingegen die freien, amöboiden Zellelemente, sowie die spezifisch differenzierten Blutzellen bei Anwendung von schwächeren Konzentrationen von Embryonalsaft besonders gut gedeihen. Auf diese Weise ist es möglich, das Schicksal der Kultur durch Änderung der Zusammensetzung des Mediums weitgehend experimentell zu beeinflussen.

Deckglaskulturen wurden nach der klassischen Methode von A. Carrel angelegt und jeden 2.—3. Tag umgebettet. Nach jeder Umsetzung wurden einzelne Kulturen jeden Satzes fixiert, um die morphologischen Veränderungen des Knochenmarkes in vitro auf jeder Entwicklungsstufe verfolgen zu können.

Gleichzeitig mit Deckglaskulturen liefen Versuche an Flaschenkulturen. Die Züchtung in Flaschen schien uns eine wertvolle Ergänzung zu sein, da sich bei ihnen das bei Deckglaskulturen ständig

erforderliche Umsetzen erübrigt. Das Wachstum kann infolgedessen lange Zeit hindurch, ohne Unterbrechung ungestört vor sich gehen.

Es empfiehlt sich nicht, frische Knochenmarkfragmente in Flaschen zu bringen. Man erzielt ein viel besseres und übersichtlicheres Wachstum, wenn man in Flaschen Kulturen ansetzt, die schon mehrere Passagen als Deckglaskulturen durchlaufen haben. Auf diese Weise wird die sofort nach der Explantation einsetzende reiche Ausschwemmung reifer, rasch zerfallender Blutzellen aus dem Mutterstück umgangen, die das weitere Bild erheblich stören.

Außer Carrelflaschen haben wir Flaschen mit abnehmbarem Boden benutzt, die hinsichtlich Form und Größe der Carrelflasche (Typ D 2) vollkommen entsprechen. Sie besitzen den großen Vorzug, daß die in den Flaschen eingeschlossene Kultur leicht und unversehrt für die histologische Bearbeitung zu erreichen ist (2).

Als feste Phase verwandten wir 0,5 Plasma und 1,0 5proz. Embryonalextraktes, als flüssige — Embryonalextrakt von verschiedenster Konzentration. Jeden 3.—4. Tag wurde die flüssige Phase abgesaugt und nach gründlichem Auswaschen mit Tyrode neue Nährflüssigkeit zugeführt.

Die Knochenmarkkulturen haben wir in lebendem Zustand und an fixierten und gefärbten Präparaten untersucht. Lebendbeobachtungen wurden an Deckglaskulturen bei Körpertemperatur mit Hilfe des heizbaren Objekttisches vorgenommen. Unter gleichen Bedingungen verwandten wir die Methode der Supravitalfärbung mit Neutralrot und Janusgrün.

Deckglaskulturen wurden als „Totalpräparate", Flaschenkulturen in Schnitten untersucht. Die Deckglaskulturen haben wir in 2proz. Ringerformol oder in Carnoy fixiert. Die in Carnoy fixierten Kulturen wurden mit Giemsa, Übersichtspräparate mit Hämatoxylin gefärbt. Zum Fettnachweis benutzten wir Sudan III. An manchen Kulturen der verschiedenen Versuchsreihen haben wir die Peroxydasereaktion angestellt. Sie wurde an Total- und Schnittpräparaten vorgenommen und nach der Modifikation von Loele mit einer wässerigen Benzidinlösung ausgeführt. In Totalpräparaten mußten die angegebenen Zeiten bedeutend verlängert werden, um eine genügend deutliche Färbung der Granula zu erzielen.

Für die Herstellung von Schnittpräparaten wurden Flaschenkulturen verwandt. Die Kultur wurde in der Flasche selbst nach Helly fixiert, in Alkohol gehärtet und in Methylbenzoatzelloidin

(Péterfi) gebracht. Danach läßt sich die im Plasma eingeschlossene Kultur leicht in Form regelmäßiger Würfel oder vollkommen planer Plättchen mit der Rasierklinge abtrennen. Die weitere Behandlung erfolgte nach allgemeinen Regeln. Die Schnitte wurden nach Pappenheim mit May-Grünwald- und Giemsalösung gefärbt.

Besonderen Wert haben wir auf eine parallele Untersuchung von Schnitt- und Totalpräparaten gelegt, da beide Untersuchungsmethoden sich durch ihre jeweiligen Vorzüge sehr gut ergänzen.

Ausgangsmaterial.

Das Knochenmark des Kaninchens besteht vorwiegend aus Zellen des myeloischen Systems. Diese machen mehr als 50 Proz. der Gesamtzellmenge aus. Die übrigen Zellen setzen sich größtenteils aus Vorstufen der Erythrozyten (40 Proz.) zusammen. Die Proerythroblasten treten gegenüber den Normoblasten an Zahl stark zurück. In beiden Zellarten finden sich reichlich Mitosen. Unter fortschreitender Azidophilie des Zytoplasmas und zunehmender Verdichtung der Kernsubstanz entwickeln sich aus den Proerythroblasten typische Normoblasten mit einem radspeichenähnlichen, deutlich exzentrisch gelagerten Kern. Die Myeloblasten sind denen des Menschen sehr ähnlich. Ihre Größe ist sehr schwankend. Weitaus am zahlreichsten von allen Zellformen der myeloischen Reihe sind Myelozyten mit dem charakteristischen chromatinarmen, runden oder gelappten Kern und wechselnder Granulierung des Protoplasmas. Mitotische Kernteilungen finden sich an diesen Zellen nicht selten. Beide Zellarten liegen, ebenso wie die Vorstufen der Erythrozyten, meist in kleinen Gruppen für sich zusammen. Die spezifische Körnelung besteht bei der Mehrzahl der Granulozyten aus ziemlich großen, dichten, sich stark leuchtend rot färbenden Körnchen und kurzen Stäbchen (spezialgranulierte Zellen von Ehrlich). Wahre eosinophile Granulozyten, deren Körnchen gröber sind und einen Stich ins Gelblich-Violette aufweisen, sowie basophil granulierte Zellen sind seltener.

Typische Lymphozyten sind nach Haam im Knochenmark des Kaninchens in wechselnder, meist sehr geringer Menge vertreten. Der Anteil der Monozyten ist gering (1—2 Proz.). Der jüngste, unreife Zelltyp im Kaninchenknochenmark wird von Witts und Webb als Primitivzelle bezeichnet. Sie besitzt einen großen runden Kern und ein hellblau gefärbtes, granulafreies Protoplasma. Knochenmarkriesenzellen finden sich reichlich. Das retikuläre Stützgerüst

des Knochenmarks ist ziemlich weitmaschig. Auf dem Schnitt zeigen die Zellen eine sternförmige Gestalt und sind miteinander durch Zellfortsätze verbunden. Charakteristisch für die Zellen des Knochenmarknetzwerkes ist der labile, lockere Bau des Kerns und die geringe Ausdehnung des Zytoplasmas.

Eigene Befunde.

Die ersten Vorgänge in der Knochenmarkkultur.

Das Knochenmark umgibt sich schon wenige Stunden nach dem Ansetzen der Kultur mit einem Ring von auswandernden Zellen. Dieser nimmt weiterhin stark an Ausdehnung zu. Es sind ausschließlich reife Blutzellen, die in dieser Entwicklungszeit auswandern. Bei weiterer Züchtung ändert sich das Bild der zellulären Zusammensetzung des Wachstumshofes entschieden. Die ausgeschwemmten reifen Blutzellen sterben im Laufe weniger Tage ab. An ihre Stelle treten jüngere Blutelemente, die sich ihrerseits allmählich in reifere Zellformen umwandeln. Während der zweiten bis dritten Passage erscheinen neben den freien Blutzellen auch spindelige Zellformen, die aus dem Mutterstück aussprossen und deren Zahl von Tag zu Tag zunimmt. Auch diese Zellen geben ihrerseits den Ursprung für freie, amöboide Zellelemente. Die Abnahme des Anteils der freien Zellen und die stetige Zunahme der spindeligen, mesenchymalen Zellformen sind der für Knochenmarkkulturen mittlerer Passagenzahl charakteristische Befund.

Bei weiterer Züchtung gehen die freien, amöboiden Blutzellen allmählich zugrunde, die fixen, spindeligen Elemente gewinnen die Oberhand und beherrschen schließlich das Bild vollständig. Auf diese Weise entsteht aus einem vorher bunten, aus zahlreichen Zellen der verschiedensten Art bestehenden Knochenmarkexplantat eine Kultur, die nur aus einer einheitlichen Zellform besteht und sich in ihrem Aussehen von einer gewöhnlichen Fibrozytenkultur kaum unterscheiden läßt. Eine solche Kultur läßt sich weiterhin beliebig lange unter dem Bilde einer Fibrozytenkolonie fortzüchten.

Der Umwandlungsprozeß einer Knochenmarkkultur in eine reine Spindelzellkultur vollzieht sich in 2 –3 Wochen. Es ist kaum möglich, die einzelnen Etappen dieses Vorgangs auf bestimmte Passagenzahlen festzulegen. Die Geschwindigkeit, mit welcher die Umbildung der Kultur abläuft, unterliegt großen Schwankungen, obwohl die Entwicklungsrichtung stets die gleiche bleibt. Für den Zeitpunkt, in dem dieses oder jenes Formenbild sich entwickelt, ist die Zu-

sammensetzung des Nährmediums von entscheidender Bedeutung. Es genügt, eine Kultur in konzentriertem Embryonalsaft wachsen zu lassen, um schon nach 3—4 Passagen das völlige Schwinden der runden Zellformen und ein intensives Wachstum der Fibrozyten zu erzielen. Dagegen begünstigt die Verwendung eines verdünnten Embryonalextraktes die Lebensfähigkeit der Rundzellen und deren Neigung zu einer Weiterdifferenzierung in hohem Maße. Durch Änderungen der Konzentration des Embryonalsaftes kann man also eine Kultur zwingen, ihren Entwick-

Fig. 1. Proliferierende Retikulumzellen und Ausschwemmung von Rundzellen. Totalpräparat. Objektiv A, Ok. 10. Leica-Aufnahme.

lungsgang in kürzerer oder längerer Zeit zu durchlaufen.

Bei der Beschreibung der Morphogenese der Knochenmarkkulturen wollen wir deshalb die Lebensäußerungen der Zellen selbst und die Hauptrichtungen ihrer Formveränderungen schildern, ohne die gesetzmäßigen Beziehungen zwischen einzelnen Entwicklungsstufen und dem betreffenden Alter der Kultur besonders zu betonen.

Die ersten Veränderungen vollziehen sich ungemein schnell und üppig. Niemals konnten wir eine merkliche Latenzperiode bei der

Entwicklung einer Knochenmarkkultur feststellen, wie wir sie beim Wachstum von Fibroblasten- oder Epithelkulturen zu sehen gewohnt sind. Schon 2 Stunden nach dem Ansetzen ist der Hof der ausgewanderten Zellen bereits bedeutend größer als das explantierte Gewebsstück. Nach 48 Stunden übertrifft der Wachstumskranz das Mutterstück bereits um ein Vielfaches.

Fig. 2. Proliferierende Knochenmarkstromazellen und Kranz von Blutzellen. Totalpräparat. Objektiv A, Ok. 10. Leica-Aufnahme.

Die mikroskopische Betrachtung ergibt, daß die Hauptmenge der ausgewanderten Zellen aus reifen, spezialgranulierten Leukozyten (Fig. 3) sowie reifen Erythrozyten besteht. Beide Zellformen, besonders die Leukozyten, werden in großen Mengen ausgeschwemmt. Dicht durchsetzen sie den Plasmatropfen bis zu seiner äußersten Peripherie.

Ein großer Teil der Leukozyten und Erythrozyten ist schon nach 24 Stunden in stärkstem Zerfall begriffen. Es finden sich überall reichlich Kerntrümmer und geschädigte Zelleiber. Zwei Momente begünstigen den Zelluntergang: einmal eine gewisse Hinfälligkeit reifer Zellformen an sich, die sich auch bei weiterer Züchtung ständig äußert, ferner die schlechten Lebensbedingungen, die durch die Massenhaftigkeit der Ausschwemmung bedingt sind. Man gewinnt geradezu den Eindruck, daß die Zellen sich gegenseitig erdrücken.

Das Schicksal der einzelnen Zellformen läßt sich bei Lebendbeobachtung am besten in den peripheren Bezirken der Kulturen

verfolgen, wo die Zellen nicht so dicht zusammengeballt liegen. Hier wandern zahlreiche polymorphkernige Leukozyten mit stark lichtbrechender Granulierung lebhaft im Plasmakoagulum umher. Bei Beobachtung auf dem heizbaren Objekttisch sieht man, wie sie Zellfortsätze aussenden, ihre äußere Form beständig wechseln und in ihrer Nähe liegende Zelltrümmer phagozytieren. Häufig strecken sie sich aus und gewinnen das Aussehen einer beinahe spindeligen Zelle, die nur durch ihren Granulagehalt und ihre eigenartige Kernstruktur von einem einfachen Fibroblasten zu unterscheiden ist. Ihr Kern liegt als dichter, stark lichtbrechender, mehrfach eingeschnürter Körper meist im nachfolgenden Teil des Zytoplasmas der wandernden Zelle und wird passiv nachgeschleppt.

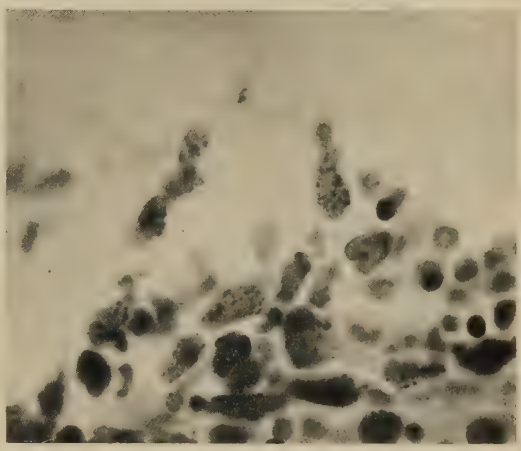

Fig. 3. Auswanderung spezialgranulierter Leukozyten. Normoblasten mit Randstellung des Kerns. Schnittpräparat. Ölimm. $^1/_{12}$. Ok. 10. Leica-Aufnahme.

An gefärbten Präparaten kann man feststellen, daß die Hauptzahl der auswandernden Zellen eine pseudoeosinophile Granulierung ihres Plasmas besitzt. Eosinophile und basophile Zellen sind ihnen in annähernd dem gleichen Zahlverhältnis beigemengt, wie es dem gewöhnlichen Zellbestand des Knochenmarks entspricht. Das Verhalten der Kerne dieser Granulozyten hinsichtlich ihrer Färbbarkeit zeigt nichts Ungewöhnliches.

Die Erythrozyten verhalten sich vollkommen passiv. Sie werden wahrscheinlich durch Saftströme mitgenommen, die der Stoffaustausch zwischen Kultur und Medium verursacht. Die Hauptmenge der Erythrozyten bleibt meist in nächster Näher des Mutterstückes liegen. Kurze Zeit behalten sie ihre ursprüngliche Form und Farbe, später sieht man sie als ausgelaugte Schatten im Plasma liegen.

Schon nach der ersten Umsetzung ändert sich das Bild bedeutend und wird erheblich übersichtlicher. Die Ausdehnung des Wachstumshofes wird geringer, die Zellauswanderung spärlicher. Die

zellige Zusammensetzung bleibt vorwiegend die gleiche; Erythrozyten und polymorphkernige Leukozyten sind aber infolge der günstigeren räumlichen Verhältnisse jetzt erheblich „gesünder“ und unversehrter.

Daneben beginnt jetzt die Auswanderung der ersten jungen, im Mutterstück so reichlich vertretenen Zellformen der myeloischen Zellreihe. Es handelt sich vorwiegend um Myelozyten (Fig. 4) und jugendliche Leukozyten von typischer Gestalt. Diese Zellen der

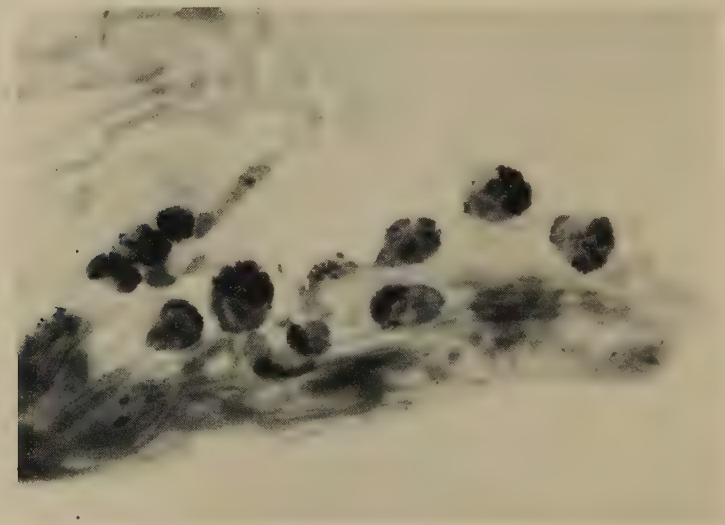

Fig. 4. Beginnende Auswanderung von Myelozyten. Schnittpräparat. Ölimm. $^1/_{12}$. Ok. 10. Leica-Aufnahme.

myeloischen Reihe sind durchaus lebensfähig; die Myelozyten zeigen zahlreiche mitotische Kernteilungen. Eine nähere Beschreibung dieser Zellen werden wir später in anderem Zusammenhang geben.

Das Schicksal der Erythroblasten und Erythrozyten.

Die Erythrozyten befinden sich auch nach der ersten Umsetzung vorwiegend in nächster Nähe des Mutterstückes. Sie erscheinen durchweg als hämoglobinarme, leicht gequollene Scheibchen. Zu ihnen gesellen sich jetzt zahlreiche Erythroblasten und Normoblasten. Es sind Zellen mit einem runden Kern, dessen Chromatin oft gitterartig angeordnet ist, und einem schmalen, mehr oder weniger hämoglobinhaltigen, vollkommen homogenen Plasmasaum. Die Kerne der Erythrozyten sind dichter und netzförmiger gebaut,

ihr schmaler Protoplasmasaum erscheint in nach Giemsa gefärbten Schnitten tief blau oder polychromatophil. Nicht selten findet man Vorstufen der Erythrozyten in mitotischer Kernteilung. Die Erythroblasten und Normoblasten besitzen keine amöboide Beweglichkeit.

Die meisten der ausgewanderten Normoblasten entwickeln sich in vitro zu reifen Erythrozyten und stehen mit den letzten durch zahlreiche Übergangsformen in fließender Verbindung. Die Kerne der Normoblasten werden allmählich kleiner und dichter, ihre Chromatinkörnchen rücken näher und näher zusammen. Den runden, vollständig pyknotischen Kern umgibt schließlich ein schmaler, stark azidophiler Plasmasaum. Die Ausreifung der so umgestalteten Normoblasten zu reifen Erythrozyten vollzieht sich durch Kernausstoßung, und zwar auf folgende Weise:

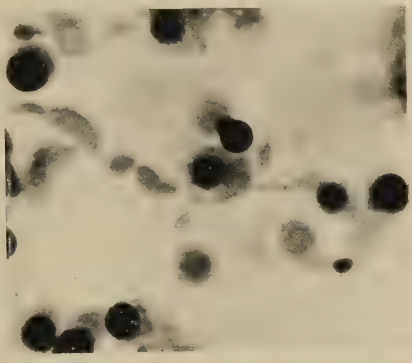

Fig. 5. Ausstoßung eines Normoblastenkernes. Schnittpräparat. Ölimm. $^1/_{12}$, Ok. 10. Leica-Aufnahme.

Der runde Normoblastenkern verliert seine bisher leicht exzentrische Lage (Fig. 3) und rückt allmählich an die Peripherie der Zelle. Sobald die Zellgrenzschicht erreicht ist, beginnt er, sich durch diese hindurchzuschieben. Zuerst tritt nur ein kleiner Teil des Kerns aus dem Normoblasten aus und bleibt mit der intrazellulär liegenden Hauptmasse der Kernsubstanz noch in breiter Verbindung. Im weiteren Verlauf preßt sich der Kern mehr und mehr durch die anscheinend sehr elastische, äußere Grenzschicht hindurch und wird dabei nach Art einer Sanduhr eingeschnürt (Fig. 5). Schließlich ist die Hauptmasse des Kerns aus der Zelle ausgetreten. In diesem Stadium kann man häufig einen kleinen, sichelförmigen, hellen Raum zwischen dem noch intrazellulär liegenden Anteil des Kernes und dem Zytoplasma beobachten. Stets tritt ein Kern, der nicht vorher der Karyorhexis anheimgefallen ist, in toto aus. Niemals bleiben Kernreste in der Zelle zurück. Der so entstandene kernlose Erythrozyt besitzt an der Stelle, an der die Ausstoßung vonstatten ging, noch einige Zeit eine deutliche Eindellung und bietet das Bild einer Glocken- oder Napfform. Nach beendeter Ausstoßung rundet sich der Kern wieder vollständig ab.

Der seit Jahrzehnten andauernde Streit zwischen den Vertretern der Ausstoßungstheorie (G. Rindfleisch, G. Bizzozero, A. Maximow, V. Schilling) und den Vertretern der Theorie einer Karyolyse (O. Israel und A. Pappenheim, O. Naegeli, H. Günther u. a.) scheint nach den an Knochenmarkkulturen gesammelten Erfahrungen sich zugunsten der Lehre von der Kernausstoßung zu entscheiden. Die Beobachtungen von Rh. Erdmann, M. van Herwerden und G. Grossmann finden in unseren Kulturen ihre volle Bestätigung.

Die Präparate der Knochenmarkkulturen erlauben es, die Umwandlung eines Normoblasten zu einem Erythrozyten mit äußerster Deutlichkeit Schritt für Schritt zu verfolgen. Als Ergebnis dieses Vorganges sehen wir einerseits die Bildung zahlreicher Erythrozyten, andererseits beobachten wir zahlreiche ausgestoßene, nackte, pyknotische Normoblastenkerne frei im Plasma oder Gewebe liegend.

Nicht immer wird der Kern unversehrt ausgestoßen. Bei manchen Normoblasten splittert er sich innerhalb der Zelle in mehrere verschieden große Fragmente auf, die sich später wieder abrunden. Manchmal entstehen dabei durch Aufsplitterung des Kerns in gleichgroße Kernbröckel typische kleeblattähnliche Formen oder auch Zellen mit gleichgroßen „Doppelkernen". Diese Zertrümmerung des Kernes scheint gänzlich regellos, ohne irgendeine innere Gesetzmäßigkeit vor sich zu gehen. Die Zelle ist anscheinend nicht imstande, die Kerntrümmer auszustoßen. Sie liegen, nachdem die Zelle zerfallen ist, frei im Plasma und werden häufig von Knochenmarkriesenzellen, polymorphkernigen Leukozyten und Polyblasten phagozytiert.

Da dem Kernzerfall in den meisten Fällen eine vollständige Auflösung der übrigen Zellbestandteile des Normoblasten folgt, darf der Karyorhexis keine besondere morphogenetische Bedeutung zugemessen werden. Es ist sehr wahrscheinlich, daß ein Teil der Normoblasten infolge der abnormen Lebensbedingungen der Gewebskultur endgültig zugrunde geht, ohne sich zu einem kernlosen Erythrozyten zu entwickeln. Die Tatsache, daß wir hier und da einzelne Erythrozyten antreffen, die in ihrem Innern Kernreste in Gestalt von „Jolly-Körpern" enthalten, spricht dafür, daß, falls hier nicht eine abnorme Kernausstoßung vorliegt, es auch bei Karyorhexis unter Umständen zur Bildung einzelner erythrozytenähnlicher Zellformen kommen kann. Die Frage, inwieweit diese abweichende Erythrozytenform den durch die normale Kernausstoßung entstandenen Erythrozyten gleichzustellen ist, bleibt freilich offen.

Der Vorgang der Kernausstoßung bei der Normoblastenreifung verläuft anscheinend mit großer Schnelligkeit. Dafür spricht der Umstand, daß die Zahl der Ausstoßungsfiguren im Verhältnis zu den großen Mengen von pyknotischen Normoblasten, ausgestoßenen Kernen sowie reifen Erythrozyten außerordentlich klein ist.

Das weitere Schicksal des in toto ausgestoßenen Normoblastenkerns läßt sich an Schnitt- und Totalpräparaten gut verfolgen. Der abgerundete, relativ große, stark pyknotische Kern mit seiner vollkommen homogenen Struktur blaßt allmählich in konzentrischen Ringen, von außen nach innen fortschreitend ab. Er färbt sich nicht mehr diffus und gleichmäßig intensiv wie früher. Seine zentralen Anteile bleiben dunkel, während die peripheren schließlich fast keinen basischen Farbstoff mehr annehmen. Auf diese Weise entstehen kleine Formen mit einem runden, kernähnlichen Gebilde in der Mitte und einem ebenfalls runden, peripheren, fast farblosen Saum, die kleinste Zellen vortäuschen könnten. Der Prozeß schreitet weiter, indem auch die zentralen Anteile ihre Färbbarkeit mehr und mehr verlieren (Fig. 6).

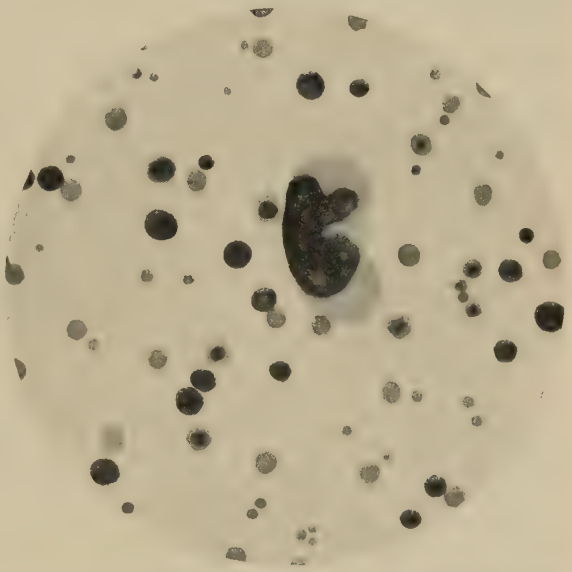

Fig. 6. Abblassungsvorgang an Normoblastenkernen. Totalpräparat. Ölimm. $^1/_{12}$, Ok. 10.

Während die Intensität der Färbbarkeit der Scheibchen weiterhin abnimmt, bleibt das Zentrum durch seine etwas dichtere Beschaffenheit noch einige Zeit deutlich zu erkennen. Schließlich verschwindet auch der letzte sich basophil färbende Anteil der Substanz der in toto ausgestoßenen, pyknotischen Normoblastenkerne.

Wir sehen im Plasma stark lichtbrechende, sehr kleine Gebilde von einheitlicher Färbbarkeit entstehen, die eine runde, seltener

eckige Gestalt besitzen und Blutplättchen in Form und Größe täuschend ähneln.

In nach Helly fixierten und nach der kombinierten Methode von Pappenheim gefärbten Schnitten läßt sich die Basophilie dieser ursprünglichen Kernsubstanz etwas länger erkennen, als in Carnoy fixierten Totalpräparaten. Die kleinen Gebilde erscheinen in Schnittpräparaten dieser Entwicklungsstufe als schwach hellblau gefärbte, homogene Scheibchen.

In dieser Beschaffenheit bleiben sie einige Zeit unverändert bestehen, um sich dann allmählich in farblose Schatten umzuwandeln. Die Entscheidung der Frage, inwiefern die auf diese Weise entstandenen Gebilde als echte Blutplättchen angesehen werden können, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. Die von V. Schilling vertretene Theorie der Blutplättchenbildung als Folge des physiologischen Entkernungsprozesses scheint ein gewisses Licht auf die von uns beschriebenen Vorgänge zu werfen.

Die Blutzellen der leukopoietischen Reihe.

Bei weiterer Züchtung nehmen die Degenerationsvorgänge mehr und mehr ab. Die meisten Zellen, die in dieser Zeit aus dem Keimstück auswandern, sind sehr gut erhalten.

Die Vertreter der myeloischen Zellreihe, die jetzt in den Vordergrund treten (Fig. 7, 8, 9, 10), setzen sich aus Myelozyten (Fig. 11) und jugendlichen Granulozyten zusammen. Das Aussehen von Myelozyten und leukozytären Jugendformen in der Kultur entspricht fast genau dem der entsprechenden Zellen in gewöhnlichen Knochenmarkschnitten.

Die Myelozyten enthalten in ihrem leicht basophilen Protoplasma die spezifischen Granula in wechselnder, anfangs noch sehr geringer Menge. Sie sind Peroxydase-positiv. Der Myelozytenkern ist rundlich, häufiger oval, kann aber auch nierenförmig und leicht eingekerbt sein. Seine Substanz ist sehr hell; das Chromatin fein verteilt. Diese Zellen vermehren sich durch mitotische Kernteilung. Mit zunehmender Reifung der Zelle steigert sich die Polymorphie ihres Kerns. Als nächste Reifungsstufe erscheinen Zellen mit typischer Granulierung und einem stabförmig gestalteten, mehr oder weniger hufeisenähnlich gebogenen Kern. Später schnürt sich der Kern ein und wird 2 -3- und mehrlappig. Es ist nicht schwer, den Umwandlungsvorgang von jungen myeloischen Zellen zu spezialgranulierten Leukozyten in den Kulturen vollständig zu verfolgen.

Die Behauptung der stattgefundenen Reifung und Umwandlung innerhalb einer gewissen Zellreihe in vitro kann nicht absolut zwingend sein. Der zeitliche Verlauf eines Vorganges darf nie ohne weiteres vom Standpunkt eines Momentbildes beurteilt werden. Eine solche Feststellung würde immer den Stempel einer mehr oder weniger berechtigten Annahme tragen. Doch scheint uns die Beobachtung der in unseren Kulturen sich abspielenden Reifungsvorgänge der myeloischen Zellen einen sehr hohen Grad von Wahrscheinlichkeit zu besitzen, und zwar aus folgenden Gründen: 1. Die reifen Formen der myeloischen Zellen sind, wie es Knochenmarks-

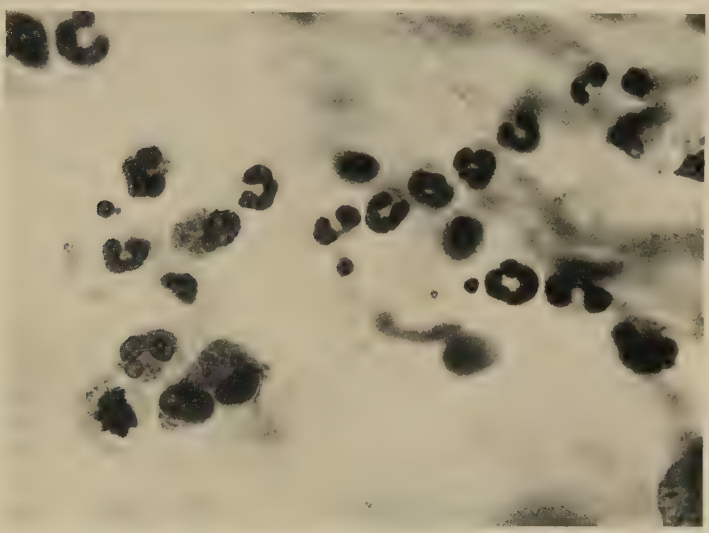

Fig. 7. Lymphoide Zellen (Myeloblasten) und reifere Formen der myeloischen Reihe in der Wachstumszone. Totalpräparat. Ölimm. $^1/_{12}$, Ok. 10. Leica-Aufnahme.

kulturen in den ersten Stufen ihrer Entwicklung zeigen, und wie es aus den gesamten gewebezüchtlerischen Erfahrungen hervorgeht, außerordentlich hinfällig und überleben selten mehr als einige Tage. Ihr Auftreten in älteren Kulturen läßt also nicht auf Überleben, sondern auf Neubildung schließen. 2. Die normale prozentuale Zusammensetzung der Elemente der myeloischen Zellbestandteile des Knochenmarksparenchyms wird bei Differenzierung einer Kultur weitgehend zugunsten reiferer Formen verschoben. Ein weiterer Beweis für die aktive Beteiligung der betreffenden Zellen bei Neubildungsvorgängen in der Kultur. 3. Das lokal und zeitlich begrenzte Auftreten von Blutbildungsherden in manchen Kulturen im Gegen-

satz zum ziemlich passiven Verhalten anderer mit gleichem Zellbestand zeugt besonders deutlich für die Existenz eines latenten, manchmal sich äußernden Reifungsvermögens.

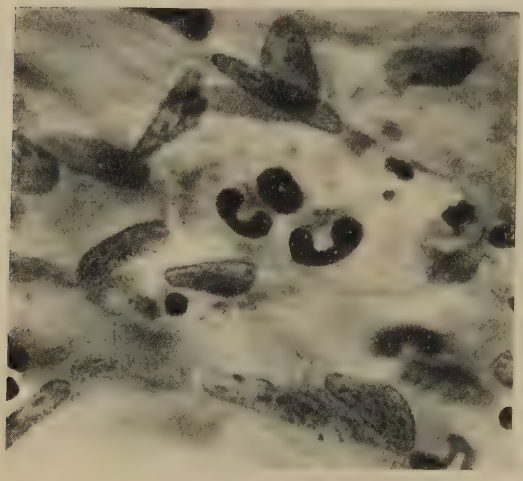

Fig. 8. Gruppe von Myelozyten in der Kultur. Totalpräparat. Ölimm. $^1/_{12}$, Ok. 10. Leica-Aufnahme.

Die Myelozyten liegen oft regellos in der ganzen Kultur verstreut. Häufig finden sie sich aber auch in nächster Nähe des Mutterstückes in der Wachstumszone. In diesen Zellanhäufungen sind ihnen jugendliche Leukozyten in größter Zahl beigemengt. Man gewinnt geradezu den Eindruck, daß bestimmte Bezirke dieser Kulturen sich zu Blutbildungsherden entwickeln.

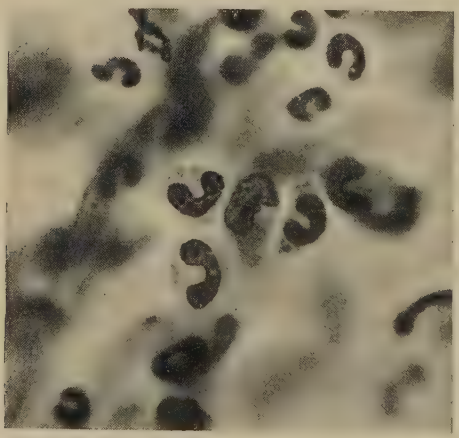

Fig. 9. Gruppe von Myelozyten und Metamyelozyten in der Kultur. Totalpräparat. Ölimm. $^1/_{12}$, Ok. 10. Leica-Aufnahme.

Solche Ansammlungen von Zellen sind manchmal sehr umfangreich und können oft hunderte und aberhunderte von myeloischen Zellen aller Entwicklungsstufen und Übergangsformen enthalten. Diese „Blutbildungsherde" finden sich in ausgeprägter Form nur in einzelnen Präparaten, in anderen sind sie oft nur mehr oder weniger angedeutet. Wir sind der Ansicht, daß die gesteigerte Proliferation und Ausdifferenzierung der Zellen der myeloischen Reihe sich nur bei Einwirken eines besonderen Gestaltungsreizes auf die Kultur verfolgen lassen, dessen Natur uns vollkommen unbekannt ist.

Bei fortschreitendem Wachstum und zunehmender Weiterentwicklung der Kultur wird der Weg, den die Blutzellbildung einschlägt, noch deutlicher. Die Neubildung von Zellen des erythropoetischen Systems läßt zwar allmählich nach, die Neubildung von Zellen der myeloischen Reihe bleibt aber sehr stark ausgeprägt und läßt sich noch weiter als bisher zurückverfolgen. Es erscheinen jetzt im Mutterstück oder den anliegenden Teilen des Wachstumshofes „Stammzellen", die einzeln für sich liegen oder in kleine Gruppen zusammengeschlossen sind. Die Mannigfaltigkeit der vorhandenen Zellformen wird erheblich größer.

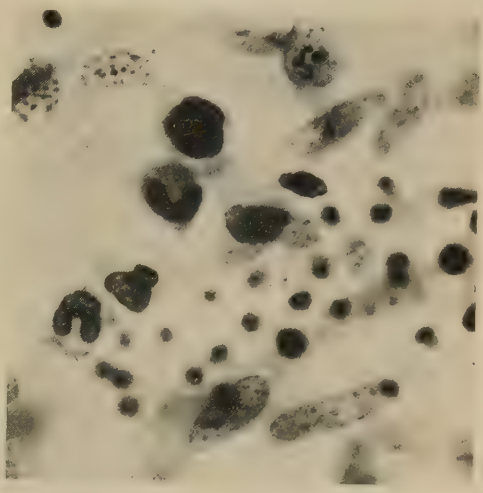

Fig. 10. Verschiedene Myelozytenformen in der Wachstumszone. Totalpräparat. Ölimm. $^1/_{12}$, Ok. 10. Leica-Aufnahme.

In den Vordergrund treten freie Zellen in großer Zahl, die durch ihren rundlichen Kern und stark basophilen Zelleib ein deutlich lymphoides Aussehen besitzen. Die Zellen dieses Typs sind durch fließende Übergänge mit den oben beschriebenen Myelozyten verbunden und müssen zweifellos als Mutterzellen der sich in der Kultur entwickelnden Zellen der myeloischen Reihe angesprochen werden. Als Hauptvertreter dieser Zellart kann man mittelgroße Zellen ansehen, die alle Eigenschaften eines Myeloblasten aufweisen (mittelgroße Lymphozyten von Maximow). Sie besitzen einen scharf begrenzten, leicht amöboid beweglichen Zelleib von mäßiger Breite. Ihr Plasma ist vollkommen homogen und färbt sich in Giemsapräparaten tief-

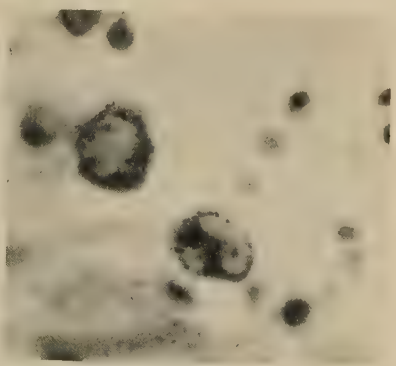

Fig. 11. Zwei Myelozyten. Schnittpräparat. Ölimm. $^1/_{12}$, Ok. 10. Leica-Aufnahme.

blau. Nur manchmal finden sich vereinzelte staubartige schwarzbraune Granula. Ihr Kern ist groß, besitzt eine runde, ovale oder

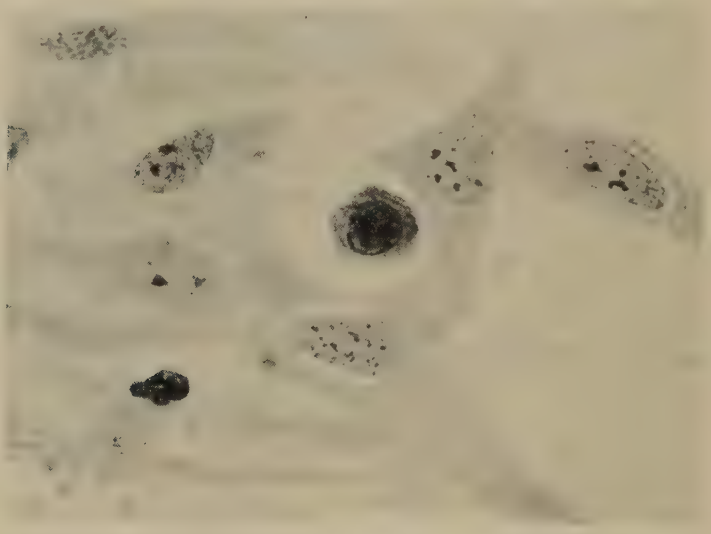

Fig. 12. Mittelgroße lymphoide Zelle (Myeloblast). Totalpräparat. Ölimm. $^1/_{12}$, Ok. 10. Leica-Aufnahme.

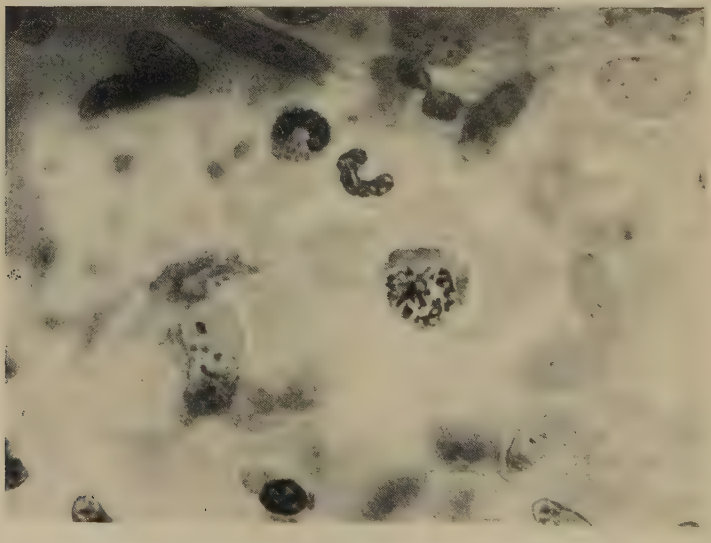

Fig. 13. Myeloblastenmitose in der Wachstumszone der Kultur. Totalpräparat. Ölimm. $^1/_{12}$, Ok. 10. Leica-Aufnahme.

leicht eingedellte Gestalt und ein netzartiges, scholliges Chromatingerüst. Meistens ist er leicht exzentrisch gelagert (Fig. 12, 13).

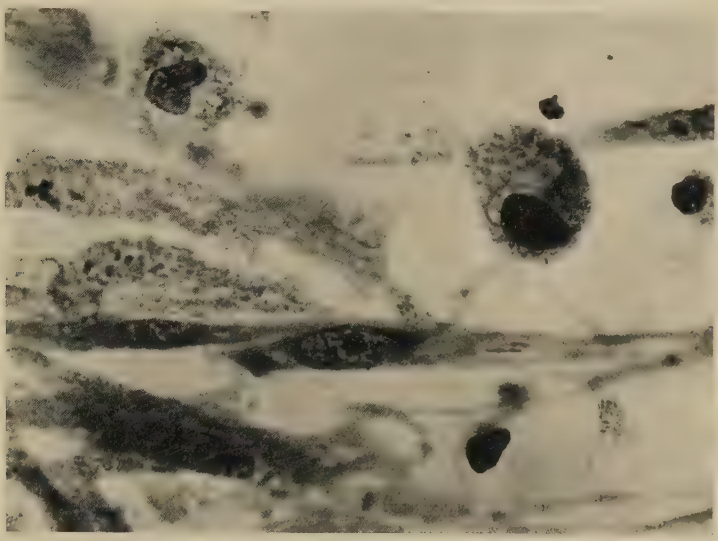

Fig. 14. Große lymphoide, basophile Blutzelle in der Wachstumszone. Totalpräparat. Ölimm. $^1/_{12}$, Ok. 10. Leica-Aufnahme.

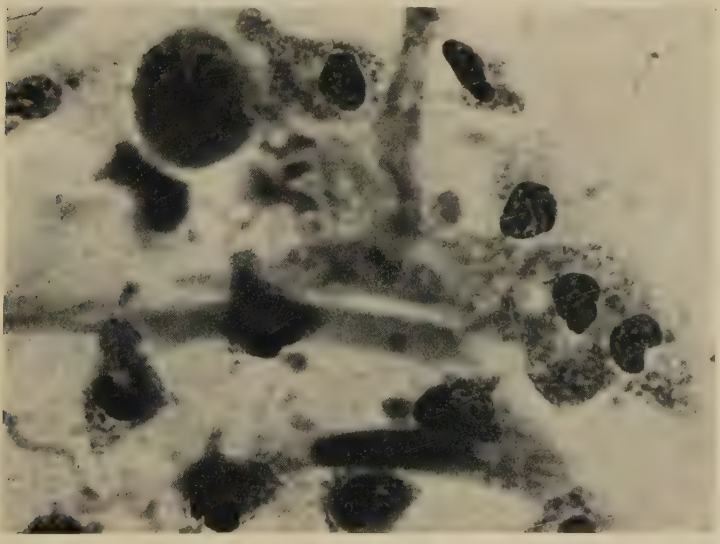

Fig. 15. Mitose einer großen, lymphoiden Zelle in der Kultur. Totalpräparat. Ölimm. $^1/_{12}$, Ok. 10. Leica-Aufnahme.

Die Größe der neuauftretenden Zellformen kann außerordentlich schwanken. Im einen Fall sieht man als untere Grenze Zellen erscheinen, welche die Größe eines gewöhnlichen Lymphozyten nicht überschreiten (Fig. 16); im anderen Fall handelt es sich um Zellen, die sich nur durch eine bedeutende Vergrößerung von Protoplasma und Kern von kleinen und mittelgroßen Myeloblasten unterscheiden (Fig. 14, 15). Wir sind geneigt, sie für Makromyeloblasten oder große Lymphozyten (Maximow) zu halten. Die beschriebenen Zellen lassen sich oft nicht scharf voneinander trennen. Trotzdem die Größe der einzelnen Zelltypen außerordentlich schwankt, haben wir den Eindruck, daß es sich bei allen Formen grundsätzlich um die gleiche Zellrasse handelt. Die Zahl der mitotischen Kernteilungen, die wir an Zellen von lymphoidem Typ beobachten, ist nur gering.

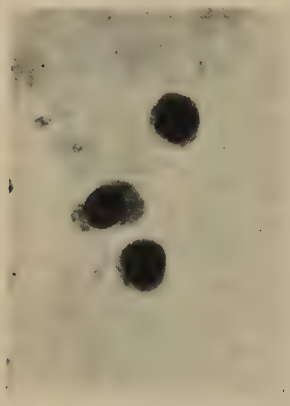

Fig. 16. 3 kleine lymphoide Zellen in der Kultur (Mikromyeloblasten). Totalpräparat. Ölimm. $^1/_{12}$, Ok. 10. Leica-Aufnahme.

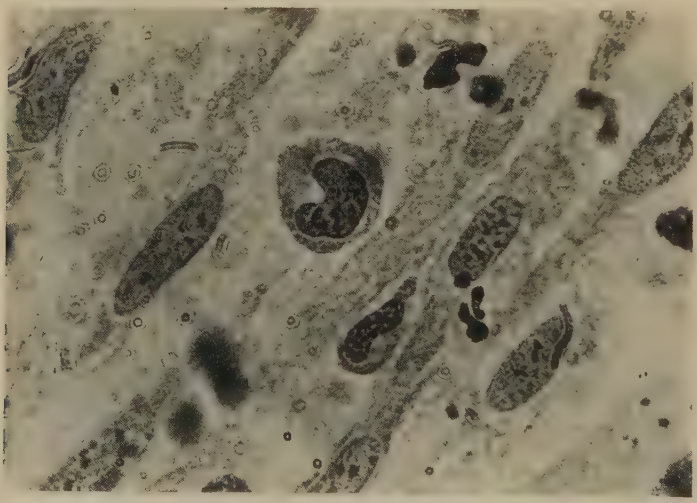

Fig. 17. Promyelozyt in der Wachstumszone einer Kultur. Totalpräparat. Ölimm. $^1/_{12}$, Ok. 10. Leica-Aufnahme.

Zwischen den Myelozyten und den Zellen lymphoiden Charakters (Myeloblasten) steht eine andere Zellform, welche manche

Eigenschaften beider in sich vereinigt (Promyelozyt). Es sind große, leicht amöboid bewegliche Zellen (Fig. 17), deren Kern hell ist und dessen Chromatin gleichmäßig, feinschwammig angeordnet ist. Das Zytoplasma färbt sich mit Azur, ist aber im Vergleich mit der Färbbarkeit des Plasmas der lymphoiden Vorstufen weitaus blasser.

Den Größenschwankungen der Stammzelle entsprechend, wechselt die Größe der Myelozyten und der jugendlichen Granulozyten. Alle diese Zellen zeigen aber, abgesehen von ihrer wechselnden Größe, an Struktur und Form keine Abweichungen. Häufig hypertrophieren

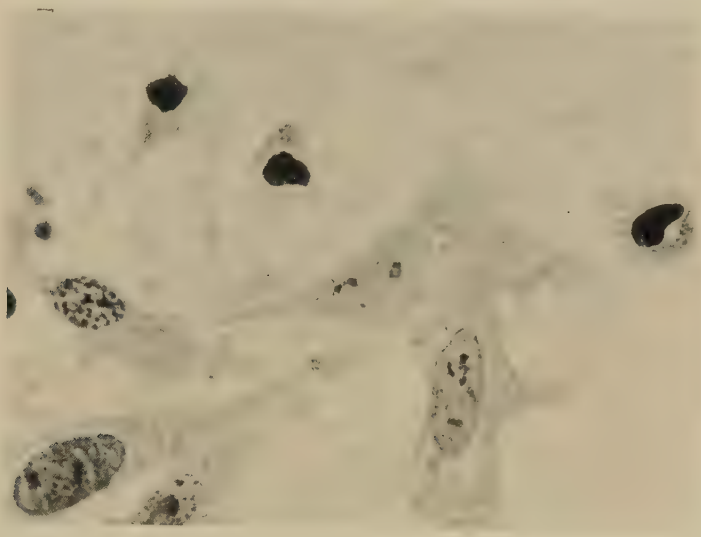

Fig. 18. Drei auswandernde lymphoide Zellen in der Wachstumszone. Totalpräparat. Ölimm. $^1/_{12}$, Ok. 10. Leica-Aufnahme.

junge Zellen der myeloischen Reihe und dehnen sich stark aus. Auf diese Weise entstehen besonders große Zellformen, deren Identifizierung trotz ihrer ungewöhnlichen Gestalt keine Schwierigkeiten bereitet.

Die Zellen vom lymphoiden Typ fungieren anscheinend nicht nur als Vorstufen reiferer, weißer Blutzellen, sondern können oft als solche längere Zeit in der Kultur bestehen bleiben und entfalten dabei ein ausgedehntes Vermögen, sich amöboid zu bewegen. Auf diese Weise werden sie zu ausgesprochenen lymphoiden Wanderzellen. Wir finden in dieser Entwicklungsperiode der Kultur Gruppen von sehr lebensfähigen Zellen in lebhafter Bewegung in den peripheren Anteilen der Kultur umherwandern.

Ihrem Aussehen nach entsprechen sie sonst ganz genau den anderen lymphoiden Zellen. Ihr Zellkörper ist aber stark in die Länge ausgezogen und sendet zahlreiche Protoplasmafortsätze aus. Ständig

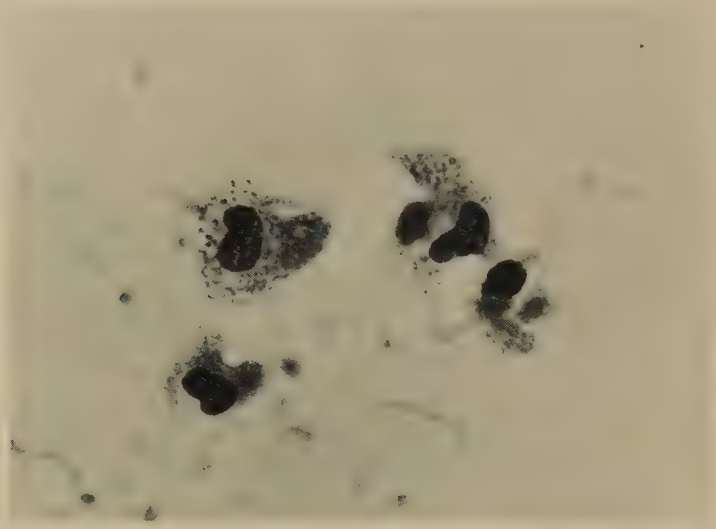

Fig. 19. Lymphoide Wanderzellen. Totalpräparat. Ölimm. $^1/_{12}$, Ok. 10. Leica-Aufnahme.

behält das Zytoplasma seine starke Basophilie, sogar die Zellausläufer sind intensiv blau gefärbt. Eine Ausbildung von Vakuolen kommt kaum zustande. Die Kerne bleiben ziemlich klein und dunkel, ihre Gestalt wird sehr unregelmäßig (Fig. 18, 19). S.V.F. läßt in ihnen vereinzelte regellos zerstreute Neutralrotgranula erkennen.

Entwicklung der Knochenmarksriesenzellen.

Während der Entwicklungsgang der kleinen und mittelgroßen Myeloblasten eindeutig ist, scheint die Entwicklungsmöglichkeit der großen lymphoiden Zellen mannigfaltiger zu sein. Wir beobachten sehr zahlreiche und überzeugende Übergangsformen von ihnen zu typischen Knochenmarksriesenzellen.

Dieser Umwandlungsvorgang verläuft in der Gewebskultur in der Weise, daß die große Stammzelle fortschreitend hypertrophiert. Die Vergrößerung betrifft Kern und Protoplasma in gleichem Maße. Der hell und blasig gewordene Kern faltet sich allmählich ein, wird vielbuchtig und erscheint bald wie aus mehreren Blasen zusammengesetzt, die kleine buckelartige Vorsprünge besitzen. Den zur Aus-

reifung führenden Veränderungen des Kerns entspricht das Verhalten des Zytoplasmas. Der Zelleib wird breiter, das Plasma

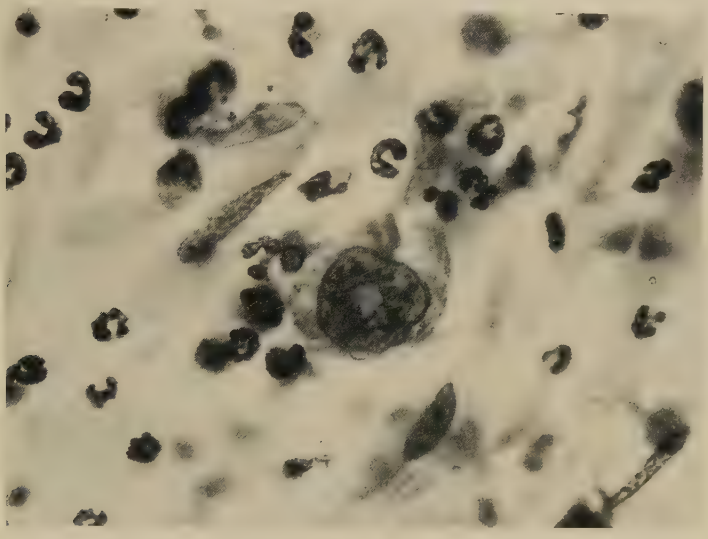

Fig. 20. Megakaryozyt in der Wachstumszone. Totalpräparat. Ölimm. $^1/_{12}$, Ok. 10. Leica-Aufnahme.

azidophiler und nimmt allmählich die charakteristische, felderartige Granulierung an.

An Fettschnitten sieht man, daß das Plasma reichlich Lipoidgranula enthält (Fig. 21), wie es von Ciaccio betont wurde.

Die Bildung von Knochenmarksriesenzellen aus großen lymphoiden Zellen scheint in Kulturen der einzig mögliche Weg ihrer Entwicklung zu sein. Eine Entstehung aus anderen Zellarten haben wir jedenfalls nicht gesehen. Riesenzellformen anderen Ursprungs, die in Knochenmarkskulturen dauernd entstehen („Kulturriesenzellen" histiozytärer Natur, mehrkernige histiozytäre Makrophagen) besitzen niemals eine auch nur entfernte Ähnlichkeit mit Megakaryozyten.

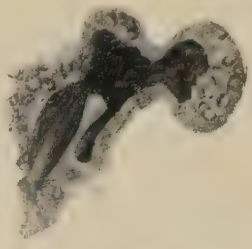

Fig. 21. Wandernder Megakaryozyt in der Kultur. (Totalpräparat. Sudan III und H. E.) Ölimm. $^1/_{12}$, Ok. 10. Leica-Aufnahme.

Ein ausgereifter Megakaryozyt ist in der Kultur voll lebensfähig. Die Knochenmarksriesenzellen müssen zu den widerstandsfähigsten Zellen der Knochenmarkkultur gezählt werden. Im Mutterstück sieht man zwar Megakaryozyten in verschiedenen Degene-

rationsstadien, die neugebildeten jedoch bleiben eine Zeitlang gesund und unversehrt.

Reife Knochenmarksriesenzellen besitzen eine ausgedehnte, wenn auch sehr träge amöboide Beweglichkeit. Sie senden außerordentlich große, breite, stumpfe Fortsätze aus. Nicht selten findet man andere Zellen im Zytoplasma der Megakaryozyten eingeschlossen (Fig. 22). Es handelt sich dabei um polymorphkernige Leukozyten, gut erhaltene Normoblasten, ausgestoßene Normoblastenkerne oder Zelltrümmer irgendwelcher Art. Aus der Tatsache, daß auch un-

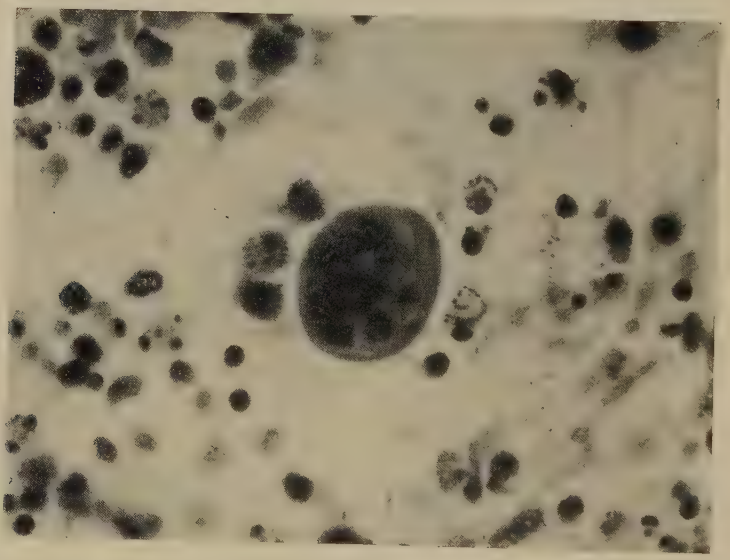

Fig. 22. Megakaryozyt in der Kultur mit zwei phagozytierten polymorphkernigen Leukozyten. Schnittpräparat. Ölimm. $^1/_{12}$, Ok. 10. Leica-Aufnahme.

bewegliche Zellelemente aufgenommen werden, muß man ein aktives phagozytäres Vermögen der Knochenmarksriesenzellen annehmen.

Die Begrenzung der Megakaryozyten ist in der Kultur stets glatt und scharf. Niemals erscheint sie in einer Art ausgefranst, die an Blutplättchenbildung, wie es Wright beschreibt, erinnern könnte. Dabei ist es ganz gleich, ob es sich um Jugendformen, ausgereifte Zellen im Zustand der Ruhe oder einer amöboiden Bewegung oder auch alternde Zellen handelt. Niemals haben wir eine Abschnürung kleinster Plasmateilchen oder eine Ausstoßung irgendwelcher Zellbestandteile oder Granulationen gesehen.

Der Untergang der Megakaryozyten der Knochenmarkkultur geht auf zweierlei Weise vor sich. Im einen Fall verklumpt das Chromatin zu einer unregelmäßig gestalteten, dichten Scholle, die

an der ursprünglichen Kernmembran helle, blasige Vorwölbungen besitzt. Das Zytoplasma wird blasser und gestaltet sich zu einer hellrosa gefärbten, homogenen, ovalen, stets scharf begrenzten Scheibe um. Als Endform bleibt nur das relativ große, pyknotische Kernkonvolut übrig. Im anderen Falle aber blaßt der Kern mehr und mehr ab und verschwindet schließlich vollständig, das Zytoplasma bleibt allein als hellrosa gefärbtes homogenes Plasmascheibchen zurück. Nach längerer Zeit löst sich auch dieses auf.

Die Wachstumsvorgänge an den Gerüstzellen (Retothelien).

Die Zellformen, die wir bisher besprochen haben, liegen nicht mehr frei im Plasma, sondern sind in ein lockeres Netzwerk von aus dem retikulären Gerüst des Knochenmarks sprossenden Spindelzellen eingebettet. Die peripheren Anteile des Mediums, in welche die Spindelzellen noch nicht vorgedrungen sind, bleiben, besonders in späteren Passagen, vollkommen zellfrei. Das proliferierende Knochenmarksretikulum entwickelt sich eigenartig und typisch. Wir wenden uns jetzt seiner Beschreibung zu.

Schon bei genauer Betrachtung einer frisch angesetzten Kultur kann man sich überzeugen, daß zwischen den in reicher Zahl ausgeschwemmten Rundzellen vereinzelte Spindelzellen aus dem Mutterstück auswachsen. Ihre Zahl steigert sich allmählich von Passage zu Passage, bis sie schließlich das Bild der Kultur beherrschen. An Totalpräparaten kann man besonders gut verfolgen, wie die Spindelzellen in radiär angeordneten Strahlen grasartig aus dem Mutterstück aussprossen. Ihre Gestalt wird dabei lang, schlank und lanzettenförmig. Später bilden sie durch Entwicklung von protoplasmatischen Fortsätzen ein inniges, engmaschiges synzytiales Zellgeflecht. Die einzelne Zelle des synzytialen Verbandes ist breitlappig und besitzt zahlreiche dünne, platte Zellausläufer. Das Zytoplasma ist feinnetzartig strukturiert, sehr leicht basophil, vollkommen granulafrei und fast immer leicht vakuolisiert. Ihr Kern ist groß, saftreich und licht gebaut. Meistens ist seine Gestalt oval, häufig enthält er zwei deutlich sichtbare Nukleolen. Nicht selten finden sich in einer Zelle 2—3 Kerne. Die Kerne selbst sind außerordentlich plastisch und passen sich in ihrer Form den jeweils in der Zelle herrschenden Bedingungen weitgehend an. Bei Auftreten von Vakuolen im Zytoplasma verändert der Kern ebenfalls seine Gestalt. Manchmal sieht man, wie sich einzelne Teile des Kerns abschnüren oder sich der Kern selbst in größere Bröckel oder kleinere Tropfen auflöst. Diese Fragmentierung kann auch durch Vakuolen oder

Ansammlungen von Zelleinschlüssen, die um den Kern herum im Plasma auftreten, hervorgerufen werden. Möglich ist, daß sich der Kern auch spontan ohne Einwirkung von außen in einzelne Teile zerstückeln kann. Niemals aber führen diese Fragmentierungsprozesse, die von zahlreichen Autoren als Amitosen gedeutet wurden, zu einer Zellteilung. Die Spindelzellen der Gewebskultur vermehren sich ausschließlich auf dem Wege der mitotischen Kernteilung. Ständig treffen wir in unseren Kulturen zahlreiche Mitosen aller Stadien.

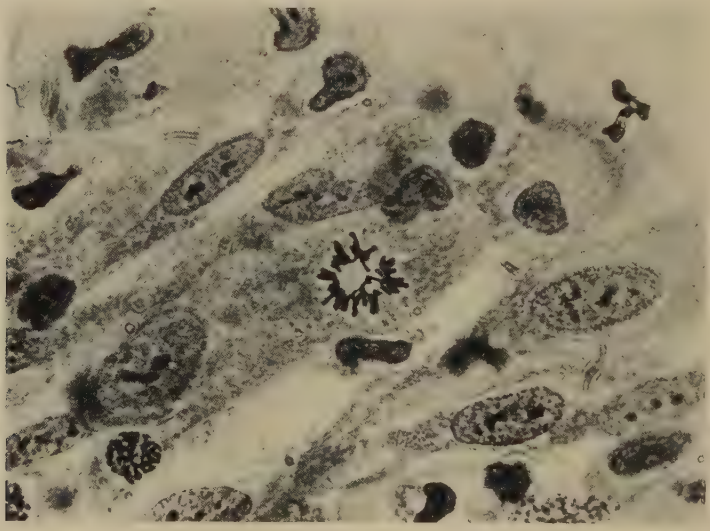

Fig. 23. Proliferierendes Knochenmarkstroma. Totalpräparat. Ölimm. $^1/_{12}$, Ok. 10. Leica-Aufnahme.

Die Veränderungen der Spindelzellen während der Mitose sind sehr charakteristisch (Fig. 23, 24). Der Zelleib kontrahiert sich, rundet sich ab, und wird deutlich basophiler. Die Zelle sendet dabei allseitig zahlreiche kurze, knopfartige Ausläufer aus und verliert zeitweise den Zusammenhang mit den benachbarten Zellen des Synzytiums. Nach Ablauf der Mitose nehmen die Zellen wieder ihre ursprünglich spindelige Gestalt an; die Ausläufer werden platt und breit.

Die Bewegungsart der Spindelzellen ist eine „eigentümliche Gleitbewegung" (Maximow). Das phagozytäre Vermögen dieser mesenchymalen Zellen ist recht stark ausgebildet. Manchmal enthalten sie in ihrem Zelleib gut erhaltene polymorphkernige Leukozyten, nicht selten speichern sie Trümmer von Zellen, die in ihrer

Umgebung untergegangen sind (zerfallene Erythrozyten, pyknotische Normoblastenkerne). Bei Phagozytose von pseudoeosinophilen Granulis entsteht manchmal das merkwürdige Bild von spezialgranulierten, spindeligen Zellelementen.

Obwohl das Aussehen der proliferierenden Retikulumzellen meist dem der Fibrozyten sehr ähnlich ist und obwohl sie sich in späteren Passagen ohne Zweifel in echte Fibrozyten umwandeln, zeigt ihr Verhalten in vitro eine Reihe von abweichenden Zügen, die ein vollständiges Gleichsetzen der Zellen beider Reihen nicht zulassen. Besonders auffallend und charakteristisch ist aber ihre Fähigkeit zur Bildung neuer, freier, amöboider Zellelemente. Diese

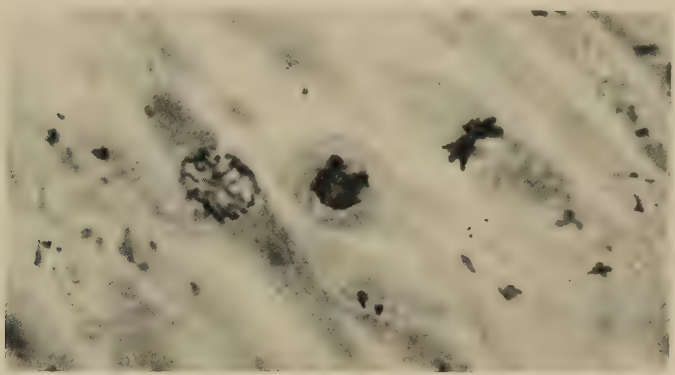

Fig. 24. Drei Retikulumzellen während der Mitose. Totalpräparat. Ölimm. $^1/_{12}$, Ok. 10. Leica-Aufnahme.

Neubildung von freien Zellen erfolgt mit großer Regelmäßigkeit und muß als ihre spezifische Eigenschaft angesehen werden. Der Vorgang der Ablösung gestaltet sich folgendermaßen:

Aus dem breiten synzytialen Verband der proliferierenden Retikulumzellen sprossen zahlreiche spindelige Zellelemente in das zellfreie Plasma aus. Diese Zellen scheinen in besonderem Maße die Träger der Teilungsfunktion der Gesamtkultur zu sein (A. Fischer). Das Ergebnis des Teilungsvorganges kann ein zweifaches sein:

Der erste Weg führt zur Ausbildung neuer Spindelzellen, die miteinander in innigem Zusammenhang bleiben. So ergibt sich eine Ausdehnung des Synzytiums in die Breite. Diese Art der Zellvermehrung entspricht durchaus dem gewöhnlichen Weg des Wachstums und der Zellteilung einer Fibrozytenkolonie in vitro.

Der andere Weg führt zur Bildung eines neuen, anders gearteten Zelltyps und gestaltet sich folgendermaßen: Die nach der

Zellteilung distal vom Mutterstück liegende Tochterzelle kehrt nicht zu der ursprünglich spindeligen Gestalt der Mutterzelle zurück, sondern bleibt als freie, annähernd runde Zelle bestehen. Das Netzwerk des Protoplasmas wird breiter und wabiger und bekommt zahlreiche Vakuolen. Der Kern bleibt einige Zeit unverändert bestehen. Er ist blasig und saftreich, sehr chromatinarm, besitzt meist ein bis zwei Nukleolen und zeigt das charakteristische Aussehen des typischen Kerns einer proliferierenden, seßhaften Retikulumzelle. Nur allmählich machen sich an ihm Veränderungen bemerkbar. Die

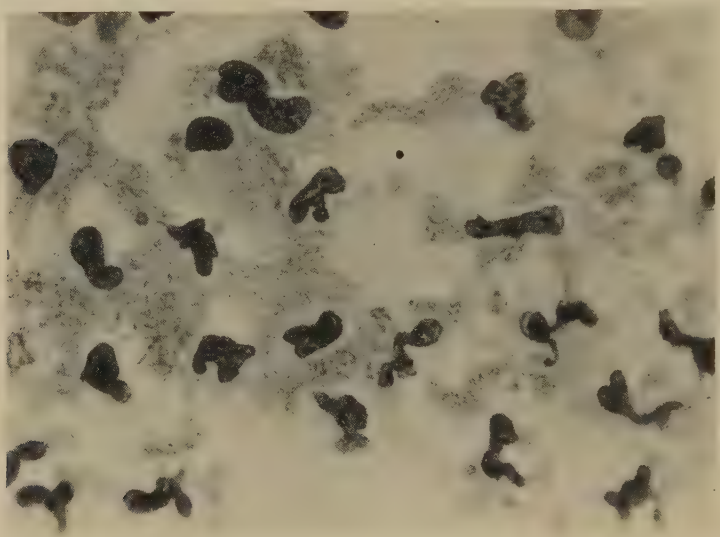

Fig. 25. Histozytäre Makrophagen. Totalpräparat. Ölimm. $^1/_{12}$, Ok. 10. Leica-Aufnahme.

Kernmembran bildet unregelmäßige Falten, die den Kern deutlich einschnüren und seine Umrisse zackiger und schärfer erscheinen lassen. Die Kernsubstanz selbst wird dichter und reicher an Chromatin.

Gleichzeitig entwickelt sich eine ausgesprochene Fähigkeit zu amöboider Bewegung. Die Zellen werden zu typischen Wanderzellen und phagozytieren sehr lebhaft.

So sehen wir am Ende dieser Entwicklung neugebildete Zellformen mit der charakteristischen Gestalt und Struktur eines retikulären Makrophagen, dessen oft mehrfach eingebuchteter Kern deutlich exzentrisch gelagert ist und dessen großer, blasser Zelleib häufig eine beinahe abenteuerliche Gestalt besitzt (Fig. 25).

Die Anpassungsfähigkeit des Kerns an Formveränderungen des amöboid-beweglichen Zelleibes ist sehr groß. Das Protoplasma enthält bei SVF. die typische, reiche Neutralrotgranulierung.

Der beschriebene Weg der Umwandlung einer fixen Spindelzelle retikulärer Herkunft zu einem Makrophagen auf dem Umweg über eine Mitose ist wahrscheinlich nicht der einzig mögliche. Man gewinnt geradezu den Eindruck, daß alle aus dem synzytialen Zellverband losgelösten Elemente mit großer Sicherheit demselben Schicksal entgegengehen. Stets trifft man am äußersten Rand des Wachstumshofes diese abgelösten typischen Spindelzellen. Dicht neben ihnen liegen aber andere freie Zellformen, die schon deutliche Anklänge an die Struktur und Gestalt eines Makrophagen besitzen. Man sieht ständig Übergangsformen von der einen in die andere Zellart, ohne dabei Beziehungen zu stattgefundenen Teilungsvorgängen aufdecken zu können. Es erscheint durchaus wahrscheinlich, daß sich diese freien Spindelzellen auch ohne eine vorangehende mitotische Kernteilung zu freien Makrophagen entwickeln können.

Ebenso wie die Neubildung von Zellen der myeloischen Reihe nicht gleichmäßig intensiv auftritt, sondern sich in bestimmten Entwicklungsstadien der Kultur stärker äußert, um später wieder abzunehmen, ist die Ausbildung von Makrophagen selten gleich stark. Kulturen von gleichem Alter lassen manchmal nur vereinzelte Makrophagen entstehen, während ihre Schwesterkulturen eine sehr üppige Makrophagenbildung aufweisen können.

In manchen Präparaten finden sich gleichzeitig typische retikuläre Makrophagen und die oben erwähnten Wanderzellen lymphoider Natur. Die Makrophagen sammeln sich infolge ihrer lebhafteren Beweglichkeit in der Peripherie des Wachstumshofes an und bilden damit dessen äußere Abgrenzung gegen das zellfreie Plasmamedium. Die kleineren, weniger beweglichen lymphoiden Wanderzellen liegen in ringartiger Anordnung mehr in nächster Nähe des Mutterstückes. Trotzdem beide Arten von Wanderzellen in manchen Erscheinungsformen gewisse gemeinsame Züge aufweisen, können wir uns nicht entschließen, das Vorhandensein irgendwelcher Beziehungen oder Zusammenhänge zwischen ihnen zu behaupten. In besonders ausgeprägten Formen sind jedenfalls die Unterschiede grundsätzlich. Während der große Makrophag dann seiner ganzen Struktur nach unzweideutig seine Beziehung zu histiozytären Zellen erkennen läßt, bleiben die kleinen Wanderzellen im Besitze der Eigentümlichkeiten, die lymphoide Zellelemente kennzeichnen. Dem großen, grobvakuoligen, stark be-

weglichen und phagozytierenden, sehr schwach basophilen Makrophag mit seinem hellen Kern steht die kleine, schärfer umrissene, lymphoide Wanderzelle mit ihrem dunklen Kern und der geringeren amöboiden Beweglichkeit des niemals vakuolisierten, stärker basophilen Protoplasmas scharf gegenüber.

Das retikulare Knochenmarknetzwerk des Mutterstücks verändert sich im Laufe der Passagen in grundsätzlich gleicher Weise, wie in der Peripherie. Eine Nekrose des Mutterstücks kommt nie zur Ausbildung. Als erste Lebensäußerung finden wir eine echte Hypertrophie der Zellen des Knochenmarkstromas. Kern und Plasma dieser Zellen werden größer und scheinen aufzuquellen. Die Kernstruktur wird dabei lichter. Schließlich lösen sich einzelne Zellen aus dem Verband. Die einen bleiben als Spindelzellen bestehen, die anderen verlieren während der Ablösung ihre längliche Gestalt und werden zu freien Makrophagen. Die Spindelzellen vermehren sich durch mitotische Kernteilung und liegen schließlich nach Art eines Fischzuges dicht nebeneinander.

Sehr deutlich läßt sich die Auflockerung und Auflösung des ursprünglichen Zellverbandes an im Schnitt quer- und längsgetroffenen Kapillaren erkennen. Der Zusammenhang der Endothelzellen untereinander löst sich schnell auf. Die Zellen werden ebenfalls zuerst größer und wachsen dann polsterartig in das ursprüngliche Lumen sowie in das lockere perikapillare Gewebe hinein.

Mit zunehmendem Alter nimmt der Formenreichtum einer Knochenmarkkultur mehr und mehr ab. Am frühesten verschwinden die reiferen Zellen der myeloischen Reihe. Die Fähigkeit der lymphoiden Stammzellen, weiße Blutzellen zu bilden, scheint sich allmählich zu erschöpfen. Auch ihre Zahl nimmt von Umsetzung zu Umsetzung mehr und mehr ab. In alten Kulturen trifft man sie nur vereinzelt zwischen die Stromazellen eingelagert. Das zellige Knochenmarkretikulum scheint seine myelopoetische Fähigkeit in vitro nach und nach einzubüßen. Die Frage, ob der Verlust der blutbildenden Potenz endgültig ist oder durch experimentelle Eingriffe neu erweckt werden kann, wurde von uns nicht angegriffen.

Am längsten bleibt die Fähigkeit des proliferierenden Retikulums zur Bildung freier Makrophagen erhalten. Früher oder später hört aber auch die Makrophagenbildung auf. Die spindeligen Retikulumzellen wandeln sich in Fibrozyten um, denen die Fähigkeit zur Ausbildung freier, amöboider Zellen anscheinend nicht zukommt. Die Ausbildung einer typischen Fibrozytenkolonie scheint andere Entwicklungsmöglichkeiten auszuschließen. Ein solcher Fibrozytenstamm kann, wie jeder irgendeines anderen Ursprungs, unendlich lange weitergezüchtet werden. Mit der Bildung einer reinen Fibrozytenkultur ist der Entwicklungsgang einer Knochenmarkkultur beendet.

Zusammenfassende Besprechung.

Unsere Untersuchungen ergeben eindeutig, daß das explantierte Knochenmark in vitro durchaus lebensfähig ist. Verschiedene Zellelemente des Knochenmarkparenchyms wie des Knochenmarkstromas sind imstande, sich in der Kultur nicht nur am Leben zu erhalten, sondern auch sich lebhaft zu vermehren. Sie weisen dabei dieselben Entwicklungsmöglichkeiten auf, die ihnen jeweils im lebenden Organismus zukommt. Nur die reifen und endgültig differenzierten Zellformen neigen in der Gewebskultur zu regressiven Veränderungen.

Es wäre falsch, in vitro ein dauerndes Bestehenbleiben des Knochenmarks in seiner Organstruktur und als funktionelle Einheit zu erwarten. Seine einzelnen, heterogenen Bauelemente suchen sich, jedes auf seine eigene Weise und für sich, den neu gegebenen Bedingungen anzupassen. Eine Knochenmarkkultur ist das Ergebnis neben- und gegeneinander laufender Anpassungs- und Entwicklungsvorgänge, die sich durchaus nicht willkürlich, sondern mit strenger Gesetzmäßigkeit vollziehen.

Drei Entwicklungsreihen können in der Knochenmarkkultur verfolgt werden. Die Entwicklung von Zellen der myeloischen Reihe, Zellen des erythropoetischen Systems sowie von Elementen des Knochenmarkstromas.

Die zahlreichen, im Knochenmark vertretenen jugendlichen Zellformen der myeloischen Reihe besitzen außerordentliche Lebens- und Entwicklungskräfte. Sie vermehren sich intensiv durch mitotische Kernteilung, treten oft als ruhende Zellen von lymphoidem Charakter oder ebenfalls häufig als amöboide, frei bewegliche Zellformen in die Erscheinung. Trotz ihres wechselnden Aussehens behalten sie ihren Grundtyp bei und sind alle einer Weiterentwicklung fähig. Diese führt schließlich auf dem normalen Wege der Ausreifung zu voll entwickelten, ausdifferenzierten spezialgranulierten Leukozyten.

Die Persistenz der lymphoiden Zelle mit blutzellbildender Potenz ist ein wesentlicher Befund in einer Knochenmarkkultur. Das lange Erhaltenbleiben einerseits und ihre Vermehrungsfähigkeit andererseits scheint diesen Zellen unter den Bedingungen des Lebens in dem neuen Milieu grundsätzlich zuzukommen.

Demgegenüber geht die Weiterentwicklung zu reiferen Zellformen nicht regelmäßig vor sich. Nur manche Kulturen zeigen im Unterschied zu anderen, großen Kulturreihen Ausreifungsvorgänge

in vollster Ausbildung. Man gewinnt den Eindruck, daß im Gegensatz zum Befund des Erhaltenbleibens und der Vermehrung der lymphoiden Zellen, welche die Kulturbedingungen zu begünstigen scheinen, der Vorgang der Weiterdifferenzierung und Ausreifung eines neuen, in der Kultur nicht immer vorhandenen Reizes bedarf. Die von uns beschriebenen Blutbildungsherde scheinen nur unter dem Einwirken eines Faktors zu entstehen, dessen Wesen und Erscheinungsbedingungen wir vorläufig nicht übersehen können.

Dieser grundsätzliche Gegensatz zwischen den Faktoren, welche die Persistenz der Zellen verschiedener Art in der Kultur sichern, und denjenigen, welche die histogenetische Weiterentwicklung zur Entfaltung kommen lassen, läßt sich während der Entwicklung der verschiedenen Knochenmarkelemente dauernd verfolgen.

Die Berechtigung, einen in bestimmter Richtung sich auswirkenden exogenen, morphogenetischen Gestaltungsreiz anzunehmen, ergibt sich durchaus aus dem Verhalten unserer Kulturen. Das Auftreten von hunderten und aberhunderten von lymphoiden Zellen, die keine Weiterentwicklung zeigen und das plötzliche Aufflammen der Ausreifungsprozesse in herdförmigen Bezirken mancher Zellkolonien spricht überzeugend in demselben Sinne.

Die erythropoetische Aktivität bedarf zu ihrer Entfaltung anscheinend eines anders gearteten Reizes. Dieser scheint unter gewöhnlichen Bedingungen nicht aufzutreten. Eine wirkliche Erythropoese findet in einer Knochenmarkkultur nicht statt.

Die Ausreifung der Normoblasten zu Erythrozyten verläuft freilich bis zur endgültigen Erschöpfung des Bestandes an Erythroblasten. Dieser Vorgang darf aber keinesfalls einer aktiven Differenzierung gleichgesetzt werden.

Wir haben also in unseren Knochenmarkkulturen einen reichen Bestand von sich aktiv vermehrenden und durchaus lebensfähigen „Stammzellen“ vor uns, die sich bei Einwirken eines unbekannten, neu hinzukommenden Reizes in reife myeloische Zellen umwandeln können. Nur in manchen Kulturen tritt dieser Reiz auf und unter seinem Einfluß bilden sich Blutbildungsherde, die aus jugendlichen und reiferen myeloischen Zellen bestehen. Eine echte Neubildung und Entwicklung von Zellformen des erythropoetischen Systems kommt dagegen nicht zustande.

Über den Ursprung der in reichem Maße sich bildenden Stammformen der Blutzellen können wir nichts Bestimmtes aussagen. Es ist wohl möglich, daß sie in der Kultur durch Vermehrung gleicher Zellformen entstehen. Es ist aber wahrscheinlicher, daß sie ihren Ursprung vorwiegend aus proliferierenden, indifferenten Mesenchymzellen nehmen. Für die letzte Anschauung sprechen zwei Gründe: einmal finden wir die in der Kultur auftretenden Stammzellen nur äußerst selten in mitotischer Kernteilung. Ferner bestehen zwischen der Zahl der auftretenden jungen Blutzellformen und dem Reifezustand des proliferierenden Stromas eindeutige Beziehungen.

Die Menge der lymphoiden Zellen mit der Fähigkeit zur Umwandlung in Blutzellen geht bei weiterer Züchtung allmählich zurück. Das proliferierende Stroma gewinnt die Oberhand, indem es sich einseitig ausdifferenziert und seine spezifische, blutzellbildende Fähigkeit allmählich zu verlieren scheint.

Am längsten bleibt die Fähigkeit des Knochenmarkstromas zur Ausbildung histiozytärer Wanderzellen erhalten. Die Makrophagenbildung ist ein Vorgang für sich. Sie ist ein histogenetischer Ablauf, der sich durch seine Endformen, die Wege der Differenzierung und die zur Entwicklung neuer Zellelemente erforderlichen Bedingungen grundsätzlich von den anderen Prozessen der Blutzellbildung unterscheidet.

Die Lebensbedingungen der Kultur („Explantationsreiz") scheinen die den Retikulumzellen zukommende Fähigkeit zur Ausbildung amöboider Wanderzellen äußerst zu fördern. Diese Fähigkeit tritt in der Kultur nicht sofort in die Erscheinung. Sie muß irgendwie erweckt werden. Ist sie einmal aufgetreten, so entwickelt sie sich mit größter Intensität weiter. Die Bedingungen in der Kultur sind anscheinend vollauf genügend, um diesen Ablauf voll zur Entfaltung zu bringen.

Das Verharren dieser beiden Zellarten in ihrer gegenseitigen Unabhängigkeit und ihrem verschiedenen morphologischen Verhalten bleibt *in vitro* andauernd bestehen. Sie ist eine Tatsache von großer biologischer Bedeutung.

Ergebnisse.

1. Das Knochenmark ist in der Kultur voll lebensfähig; seine einzelnen Bestandteile besitzen ein ausgesprochenes Vermehrungsvermögen.

2. Die Elemente der verschiedenen Zellreihen besitzen eigene Entwicklungs- und Differenzierungsfähigkeit.

3. Die Zellen vom lymphoiden Typ (Myeloblasten) vermehren sich lebhaft und können als solche in der Kultur längere Zeit bestehen bleiben. Im Bereich des Mutterstücks behalten sie dabei ihre charakteristische Form, in der Wachstumszone können sie sich in lebhaft wandernde Zellen umgestalten, die aber stets ihren lymphoiden Charakter beibehalten.

4. Unter Umständen vermögen sich die lymphoiden Zellen (Myeloblasten) in der Richtung der Myelozyten und spezialgranulierten Leukozyten auszudifferenzieren.

5. Dieser Differenzierungsvorgang wird auf die Wirkung eines besonderen, in der Kultur nicht ständig vorhandenen Gestaltungsreizes zurückgeführt.

6. Die Neubildung lymphoider Blutstammzellen geschieht wahrscheinlich aus proliferierenden, indifferenten Mesenchymzellen des Knochenmarkretikulums. Dieses büßt bei weiterer Züchtung allmählich seine Fähigkeit zur Ausbildung lymphoider Stammzellen ein.

7. Eine Neubildung von Erythroblasten findet in der Kultur nicht statt.

8. Die Ausreifung von Normoblasten zu Erythrozyten vollzieht sich demgegenüber in vitro regelmäßig.

9. Die Umwandlung von Normoblasten zu Erythrozyten geschieht durch Ausstoßung des Kerns.

10. Die ausgestoßenen Normoblastenkerne wandeln sich zu farblosen Scheibchen um, die eine gewisse Ähnlichkeit mit Blutplättchen aufweisen.

11. Knochenmarkriesenzellen (Megakaryozyten) bilden sich in der Kultur aus größeren lymphoiden Zellelementen. Sie sind durchaus lebens- und widerstandsfähig, bewegen sich amöboid und phagozytieren lebhaft.

12. Das Knochenmarkstroma proliferiert in der Kultur sehr lebhaft. Bei zunehmendem Alter der Kultur gewinnt es die Oberhand über das Wachstum aller anderen Zellarten.

13. Nach einer bestimmten Entwicklungszeit der Kultur werden die Stromazellen zu einer lebhaften, zellbildenden Tätigkeit angeregt. Die Spindelzellen wandeln sich teilweise in retikuläre Makrophagen um.

14. Der in der Kultur entstandene retikuläre Makrophag ist ein Zelltyp für sich, der ständig seinen Ursprung aus dem Knochenmarkretikulum morphologisch und funktionell erkennen läßt.

15. Zwischen beiden in der Knochenmarkkultur sich entwickelnden Hauptreihen von Zellen — lymphoide und histiozytäre Zellelemente — bestehen keine faßbaren Übergänge.

16. Bei lange dauernder Züchtung wandeln sich die proliferierenden Knochenmarkstromazellen in typische Fibrozyten um. Die Knochenmarkkultur kann dann in Gestalt einer Fibrozytenkolonie beliebig lange weiter gezüchtet werden.

Literaturverzeichnis.

1. Bermann, G., Über die Infektion von Knochenmarkkulturen jugendlicher und ausgewachsener Meerschweinchen mit Staphylococcus pyogenes aureus. Arch. exper. Zellforschg **1**, 392 (1925).
2. Doljanski, L., Die neue Züchtungsflasche für Gewebskulturen. Arch. exper. Zellforschg **13**, 717 (1932).
3. Erdmann, Rh., Cytological observations on the behaviour of chicken bone marrow in plasma medium. Amer. J. Anat. **22**, 173 (1917).
4. Fischer, A., Gewebezüchtung, 3. Aufl. München, Müller u. Steinicke, 1930.
5. Foot, N. C., Über das Wachstum von Knochenmark in vitro. Beitr. path. Anat. **53**, 446 (1912).
6. — The Growth of chicken bone marrow in vitro and its bearing on hematogenesis in adult life. J. of exper. Med. **17**, 43 (1913).
7. Günther, H., Normale und pathologische Morphologie der Erythrozyten. Handb. der allg. Hämatologie, Bd. 1, Berlin, Urban & Schwarzenberg, 1932.
8. Grossmann, W., Über Knochenmark in vitro. Beitr. path. Anat. **72**, 165 (1923).
9. Haam, E., Knochenmark. R. Jaffé, Anatomie und Pathologie der Spontanerkrankungen der kleinen Laboratoriumstiere. Berlin, J. Springer, 1931.
10. van Herwerden, M., Cultures de moelle osseuse en dehors de l'organisme. Arch. néerl. Physiol. 8, 592 (1923).
11. v. Jeney, A., Beobachtungen über das Verhalten blutbildender Organe in Gewebekulturen. I. Kongr. Internat. Mikrobiol., Paris 1930.
12. Klieneberger, Carl, Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere. Leipzig, J. A. Barth, 1927.
13. Maximow, A., Bindegewebe und blutbildende Gewebe. Handbuch der mikrosk. Anat. W. v. Möllendorff, Bd. 2. Berlin, J. Springer, 1927.
14. Mas y Magro, F., Untersuchungen über die normale Erythropoese und zur Frage der Dedifferenzierung der Erythroblasten in-vitro Kulturen. Arch. exper. Zellforschg **12** (1932).
15. Michels, N., Cultures in vitro d'organes hématopoïétiques embryonnaires. Soc. sci. Bruxelles **43**, 148 (1923).
16. Naegeli, O., Blutkrankheiten und Blutdiagnostik, 4. Aufl., Berlin, J. Springer, 1923
17. Schilling, V., Physiologie der blutbildenden Organe. Handb. der norm. u. path. Physiol., Bd. 6, Teil II. Berlin, J. Springer, 1928.
18. Seemann, G., Zur Technik der Supravitalfärbung. Z. wiss. Mikrosk. **47**, 323 (1930).
19. Tower, R. W., and Herm, C. F. The intranuclear origin of the mammalian red blood corpuscles observed in living cultures. Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **14**, 51 (1916/17).

Lebenslauf.

Ich, Herbert Christian Rasmussen, wurde am 5. Februar 1908 in Altona-Othmarschen als Sohn des damaligen Landgerichtsrates Dr. Paul Rasmussen und seiner Ehefrau Margarete, geb. Danke geboren. Von Ostern 1917 bis Ostern 1925 besuchte ich das Domgymnasium in Naumburg a. S. Anschließend war ich auf dem staatlichen Gymnasium in Kiel, wo ich Ostern 1926 die Reifeprüfung bestand. Nach dem Studium in Kiel und Freiburg i. Br. bestand ich die ärztliche Vorprüfung in Kiel am 5. Mai 1928, nach weiterem Studium in Kiel und Berlin in Berlin die ärztliche Staatsprüfung am 5. Dezember 1931. Während des praktischen Jahres arbeitete ich 8 Monate am Pathologischen Institut der Universität Berlin, Charité-Krankenhaus (Direktor: Prof. Dr. R. Roessle) und 4 Monate am städtischen Hufeland-Hospital in in Berlin (Direktor: Prof. Dr. Rosenow). Die Approbation als Arzt erhielt ich am 1. Februar 1933.